

イネの高度耐冷性及びいもち病抵抗性遺伝子を導入した「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統の育成

著者	遠藤 貴司
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第15892号
URL	http://hdl.handle.net/10097/58281

イネの高度耐冷性及びいもち病抵抗性
遺伝子を導入した「ひとめぼれ」
準同質遺伝子系統の育成

遠 藤 貴 司

目 次

第Ⅰ章 緒 論	1
第Ⅱ章 耐冷性 QTL を導入した「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統の育成	6
第 1 節 既知の耐冷性 QTL を導入した「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統の 耐冷性評価	
第 2 節 ブータン品種「Kuchum」に見出された新規耐冷性 QTL の同定と 耐冷性 QTL の集積効果	19
第Ⅲ章 白葉枯病抵抗性と密接に連鎖したいもち病圃場抵抗性遺伝子の候補 領域の同定	38
第 1 節 白葉枯病抵抗性遺伝子 <i>Xa1-as(t)</i> と連鎖したいもち病圃場抵抗性遺伝子 <i>Pias(t)</i> の候補領域の絞り込み	
第 2 節 いもち病圃場抵抗性遺伝子 <i>Pias(t)</i> の由来と他の農業形質評価	59
第Ⅳ章 耐冷性といもち病抵抗性を導入した「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統の 農業形質評価	68
第Ⅴ章 総合考察	82
第Ⅵ章 摘 要	87
謝 辞	91
引用文献	93

第 I 章 緒 論

北海道や東北地方太平洋側における稲作地帯では、夏季にオホーツク高気圧から吹き出す冷涼で湿潤な北東風(やませ)の影響により、不稔障害を主因として減収する冷害にしばしば遭遇している(和田 1992)。近年、温暖化が進行しているといわれているが、北日本の7~8月の平均気温の上昇傾向は認められず(下野 2008)、東北地方北部において8月にやませ型低温は増加するとの報告(遠藤ら 2007)もあり、今後も北日本において安定的に稲作を継続していくには、引き続き、冷害に対して技術的な対策を講じていく必要がある。

1881年から1994年までの東北地方における水稻単収の記録によれば、冷害による減収は114年のうち26回となり、4.4年に1回の頻度で冷害が生じていたことを示している(西山 1996)。冷害の種類は、登熟期間の冷温により登熟不良が生じて減収する遅延型冷害と、穂ばらみ期や開花期の冷温による不受精を起因として減収する障害型冷害に大別される(和田 1992)が、近年は、早生品種の普及が進み、障害型冷害の発生が主となっている。冷温による不稔が最も発生しやすい時期は、出穂前10日頃とされているが、Satake(1970)の花粉発育時期と受精率の研究により、イネが最も冷温に感受性が高い時期は、葯内の花粉母細胞が減数分裂し、四分子期を経て小孢子が花粉へと成長が始まる小孢子初期であることが明らかになっている。また、冷温による不稔の発生機作については、西山(1984)が、葯内の糖代謝系に異常が生じ、花粉形成や発育が阻害されることで充実花粉数が減少し、葯が裂開不良を起こして不

稔が発生するとしている。現在、冷害対策技術として、穎花分化期から小孢子初期まで(前歴期間)の深水(10cm)と危険期(小孢子初期)の深水(15~20cm)を組み合わせ、冷温から幼穂を保護する深水管理が有効であることが明らかになり(Satake et al. 1988)、実践されている。しかしながら、十分な水深が確保できない圃場や、省力、低コストの栽培管理が進む中、深水管理が十分実施できない場合もある。このようなことから、耐冷性品種の利用は、省力で導入コストがかからず、圃場条件を選ばないため、汎用的な冷害対策技術として有効である。

宮城県の水稲基幹品種である「ひとめぼれ」は、1991年に宮城県古川農業試験場で育成され、「愛国」由来の耐冷性遺伝子を「コシヒカリ」を経由して受け継いでいると考えられ、耐冷性のランクは“極強”と評価されている(佐々木 1994)。100年に一度と言われた1993年の冷害では、宮城県は作況指数が38となったが、「ひとめぼれ」は優れた耐冷性を発揮し、宮城県の主力品種が「ササニシキ」から「ひとめぼれ」に替わる大きな転機となった。一方、1993年は「ひとめぼれ」であっても、冷温の遭遇時期によっては不稔障害を生じたこともあり、耐冷性のさらなる強化が求められている。これまで、耐冷性“極強”を超える品種の開発は、日本のイネ品種を利用した育種が中心であり、「はたじるし」(松永ら 2002)が育成されている。さらなる耐冷性の強化を図るには、海外の遺伝資源を含めた多様な遺伝子の導入が必要であると考えられるが、外国稲等を利用した育成系統は、耐冷性が優れていても、長稈、少収、倒伏しやすい、玄米品質が劣るなどの不良形質が排除できず、実用品種の育成は困難であった(遠藤ら 2013)。

DNAマーカー育種は、不良形質の連鎖を排除したり、連続戻し交配による目的形質のみを導入した準同質遺伝子系統を育成したり、意図的に複数のQTLを集積できることから、外来遺伝資源を利用した育種に有効な手法である。これまで、穂ばらみ期耐冷性に関するQTLがいくつか報告されている(Saito et al. 1995、Takeuchi et al. 2001、Andaya and Mackill 2003、Dai et al. 2004、Kuroki et al. 2007、Xu et al. 2008a、Kuroki et al. 2009、Suh et al. 2010、Mori et al. 2011、Shirasawa et al. 2012)。しかしながら、これらのQTLは、耐冷性の検定方法や検定条件、供試品種が異なるために、効果を単純に比較することはできず、これらのQTLを実際に実用品種へ導入した事例は少ない。Mori(2011)は、インドネシア品種「Silewah」との交配に由来する高度耐冷性育成系統の解析により、Saito(1995)が報告した「Silewah」由来のQTLとは異なるQTLを検出しており、QTLの効果が、環境要因の影響を受けることを指摘している。したがって、耐冷性QTLの効果は、気温や日長などの生育条件や導入する品種の遺伝的背景によって異なると考えられるため、DNAマーカーを使った耐冷性育種を進めるには、東北地方で有効な耐冷性QTLを探索し、その効果を明らかにする必要がある。

冷害年は不稔障害といもち病が同時に発生することは古くから知られており(越水 1976)、1976、1980、1988、1991、1993、2003年の冷害では、いもち病が多発している(東 1996、農林水産省大臣官房統計情報部 2004)。いもち病(*Magnaporthe grisea*)は、水稻の主要な病害であり、日本の稲作では、いもち病の発生による減収を回避するために、防除薬剤を使用するのが一般的である(山中・山口 1987)が、いもち病抵抗性に関する遺伝子が多数見つかり、それらを品種に導入することはい

もち病防除に有効である。いもち病抵抗性は、レース特異的である単一の主働遺伝子によって支配される真性抵抗性と、レースに特異的でなく少数の主働遺伝子あるいは多数の微働遺伝子によって支配され、量的な抵抗性を示す圃場抵抗性が知られている(浅賀 1981)。これまで、真性抵抗性遺伝子を単一で導入した場合、品種を普及した数年後に親和性のレースが出現したことにより、抵抗性が崩壊した事例が知られている(Kiyosawa 1982)。このため、真性抵抗性遺伝子を利用した耐病性育種は、異なる真性抵抗性遺伝子を導入した系統を混合栽培する方法が有効であるとされ(Koizumi et al. 2004、Mundt 2002、Zhu et al. 2000)、「ササニシキ」や「コシヒカリ」のいもち病抵抗性準同質遺伝子系統(Near-isogenic line)のマルチラインが育成され、既に実用化されている(Abe 2004、Ishizaki et al. 2005)。一方、圃場抵抗性は、抵抗性の崩壊の危険性が少なく、安定的な抵抗性を持続的に発揮することから、日本のイネ育種では、圃場抵抗性の改良を中心とした育種が行われている。こうした中で、日本水稻同士の圃場抵抗性の集積、陸稻の高度な圃場抵抗性遺伝子を利用した品種育成が試みられてきた(東 1996、Saka 2006、山口 2009)。

高度な圃場抵抗性を示す遺伝子として*Pb1*(藤井ら 1999a)、*pi21*(Fukuoka and Okuno 2001)、*Pi39t*(Terashima et al. 2008)、*Pi34*(Zenbayashi et al. 2007)、*Pi35t*(Nguyen et al. 2006)が報告され、これらの遺伝子を導入した品種が育成されている(「コシヒカリ愛知SBL」、「ともほなみ」、「みねはるか」、「中国IL1~2号」、「ゆきのはな」)。この中でも、穂いもちに対して抵抗性を示す*Pb1*については、20年以上の長期間にわたり安定的な抵抗性を示すことが明らかになっており(藤井ら 1999b)、「祭

晴れ」、「大地の風」といった実用品種が育成されていることから、実用性が高いいもち病抵抗性遺伝子と考えられる。また、*Pb1*はDNAマーカーによる選抜の有効性も実証されており(杉浦ら 2004)、いもち病抵抗性育種を効率的に進められる状況にある。さらに、近年、陸稲由来のいもち病抵抗性遺伝子*pi21*が、食味が低下する遺伝子座と強連鎖しているが、DNAマーカーによりその連鎖が取り除けることが明らかとなっており、その育種への利用が期待されている(Fukuoka et al. 2009)。いもち病を安定的に防除するには、様々ないもち病抵抗性遺伝子を見出し、複数の抵抗性遺伝子を組み合わせ利用することが有効と考えられる。

以上のことから、本研究では、冷害年のイネの不稔障害やいもち病の被害を軽減することを目的として、耐冷性を向上させるQTLやいもち病抵抗性遺伝子を、DNAマーカーを用いて宮城県の主力品種の「ひとめぼれ」に導入し、収量性や食味といった「ひとめぼれ」の優良な農業形質を維持したまま、穂ばらみ期耐冷性やいもち病抵抗性を強化した「ひとめぼれ」の準同質遺伝子系統を育成することを試みた。

第Ⅱ章 耐冷性 QTL を導入した「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統の育成

第1節 既知の耐冷性 QTL を導入した「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統の耐冷性 評価

イネの低温障害の一つに、穂ばらみ期の低温による不稔障害がある(西山 1996)。不稔障害は、低温により健全な花粉の形成や発育が阻害されることにより生じるもので、北海道や東北地方の太平洋側における稲作において、ときに甚大な減収の被害を引き起こしてきた。近年では、1993年と2003年の冷害の被害が大きく、この2年における作況指数は、北海道で40、73、青森県28、53、岩手県30、73、宮城県37、69であった(農林水産省経済局統計情報部 1995、農林水産省大臣官房統計情報部 2004)。特に1993年の冷害による被害額は、宮城県が1,300億円、東北全体では約5,000億円となり(西山 1996)、国内で米不足が生じ、海外から米を緊急輸入する事態となり、その経済的、社会的影響は大きかった。

北海道や東北地方太平洋側におけるイネの品種開発において、穂ばらみ期耐冷性の強化は、重要な育種目標の一つである。これまで、従来の交雑育種による品種改良が進められてきたが、近年はゲノム解析技術が発達してきたため、外来遺伝資源からの優良形質の導入や、不良形質の排除が容易になり、DNAマーカー選抜による各種形質の改良が進んでいる。

イネの穂ばらみ期耐冷性に関するQTLとして、*Ctb1*、*Ctb2*(Saito et al. 2001)、

qCT-1, 7, 11 (Takeuchi et al. 2001)、*qCTB1*, 2a, 2b, 3, 5, 6, 7, 9, 12 (Andaya and Mackill 2003)、*qCTB1-1*, 1-2, 8 (Kuroki et al. 2007、黒木ら 2011)、*qRCT3*, 6a, 6b, 7 (Dai et al. 2004)、*qPSST-3*, 7, 9 (Suh et al. 2010)、*qCTB-1-1*, 4-1, 5-2, 10-2, 11-1 (Xu et al. 2008a)、*qLTB3* (Shirasawa et al. 2012)、*qCTB3-Silewah* (Mori et al. 2011)が報告されている。しかしながら、これらのQTLを実用品種に導入した事例は少なく、「ひとめぼれ」の耐冷性の強化に有効なQTLがどれであるかは明らかではない。

本研究では、宮城県の主力品種「ひとめぼれ」に「Silewah」由来の耐冷性QTL (*Ctb1*, *Ctb2*)と「北海PL9」の耐冷性QTL (*qCTBy8*)を導入し、「ひとめぼれ」の耐冷性準同質遺伝子系統を作出し、その耐冷性の向上効果について検討した。以降、本論文では、耐冷性といった場合は、穂ばらみ期耐冷性を示すものとする。

1) 材料及び方法

(1) 「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統の育成

インドネシア品種「Silewah」を耐冷性の供与親、「ひとめぼれ」を反復親として、4 回戻し交配を行い、*Ctb1*, *Ctb2*を単独、あるいは両方含む領域が、「Silewah」型の 16 系統と前の世代は同一系統でありながら、系統養成の過程で *Ctb1*, *Ctb2*を含む領域が「ひとめぼれ」型になった 3 系統の計 19 系統育成した。*Ctb1*を含む 541kbp を持つ系統が 2 系統(2008 年に B₄F₅ 世代)、*Ctb2*を含む 1,327kbp を持つ系統が 1 系統(2008 年に B₄F₅ 世代)、*Ctb1* と *Ctb2* を共に含む 2,438kbp を持つ系統が 3 系統(2009～

2011 年に $B_4F_7 \sim B_4F_9$ 世代)、前の世代は同一系統であり、*Ctb1*、*Ctb2* を含む 2,438kbp の領域が「ひとめぼれ」型になった系統が 3 系統(2009 年に B_4F_7 世代)、*Ctb1* と *Ctb2* を含む 3,377kbp を持つ系統が 4 系統(2008 年に B_4F_5 世代)、*Ctb1* と *Ctb2* を含む 3,708kbp を持つものが 2 系統(2008 年に B_4F_4 世代)、及び *Ctb1* と *Ctb2* を含む 5,445kbp を持つものが 4 系統(2008 年に B_4F_5 世代)である。

同様に、「北海 PL9」を耐冷性の供与親、「ひとめぼれ」を反復親として、4 回戻し交配を行い、*qCTB8* を含む領域が「北海 PL9」型の 6 系統と前の世代は同一系統でありながら、系統養成の過程で *qCTB8* を含む領域が「ひとめぼれ」型になった 1 系統の計 7 系統を養成した。*qCTB8* を含む 3,229kbp を持つものが 5 系統(2008 年に B_4F_3 世代)、*qCTB8* を含む 1325kbp をもつものが 1 系統(2009、2011 年にそれぞれ B_4F_5 、 B_4F_6 世代)、前の世代は同一系統でありながら、系統養成の過程で *qCTB8* を含む 1325kbp の領域が「ひとめぼれ」型になった 1 系統(2009 年に B_4F_5 世代)である。

「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統における各 QTL 座の導入領域と系統数を図 1 と表 1 に示す。

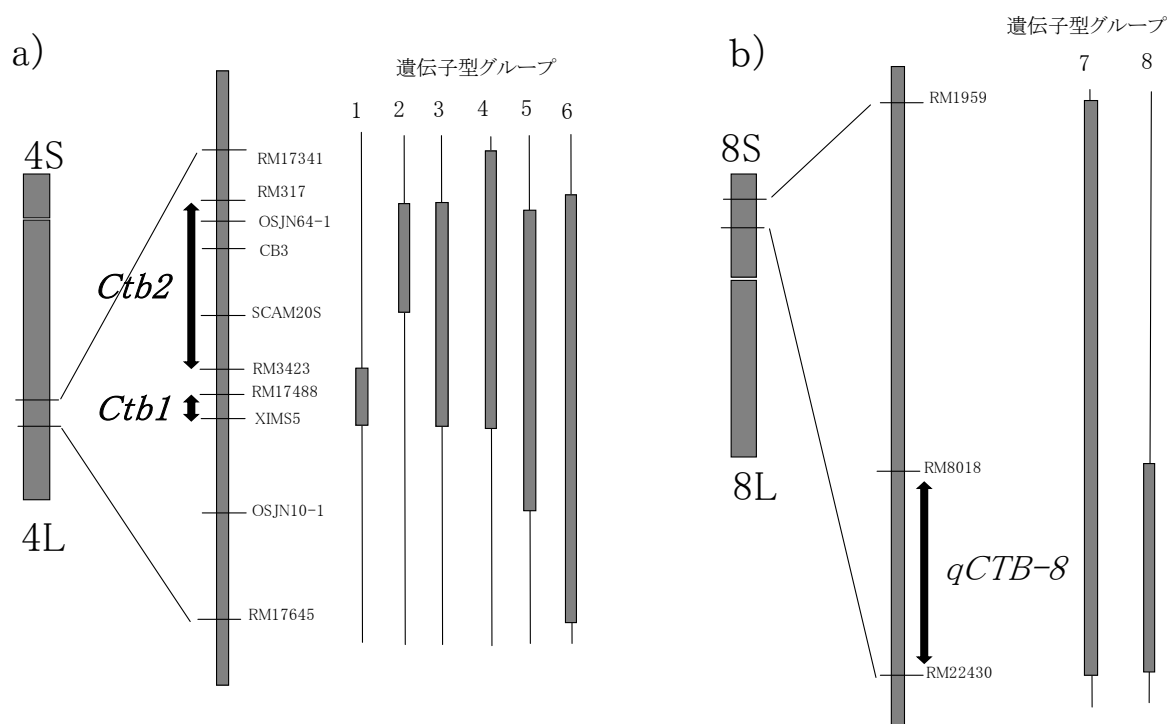


図1 「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統における耐冷性 QTL の導入領域

a)遺伝子型グループ 1～6 は「Silewah」、b)遺伝子型グループ 7、8 は「北海 PL9」を耐冷性供与親とする。耐冷性供与親に由来する領域をボックスで、「ひとめぼれ」に由来する領域を線で示す。4S、4L、8S、8L は、それぞれ、第4染色体短腕、第4染色体長腕、第8染色体短腕、第8染色体長腕を示す。

表1 「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統における耐冷性QTLの導入領域と系統数

グループ名	QTL	耐冷性 供与親	導入領域	導入領域長 ^{注1)} (kbp)	系統数	
					「耐冷性供与親」型	「ひとめぼれ」型
1	<i>Ctb1</i>	Silewah	RM3423～XAIMS5	541	2	
2	<i>Ctb2</i>		RM317～SCAM20S	1,327	1	
3	<i>Ctb1</i> , <i>Ctb2</i>		RM317～XAIMS5	2,438	3	3
4	<i>Ctb1</i> , <i>Ctb2</i>		RM17341～XAIMS5	3,377	4	
5	<i>Ctb1</i> , <i>Ctb2</i>		OSJN64-1～OSJN10-1	3,708	2	
6	<i>Ctb1</i> , <i>Ctb2</i>		RM317～RM17645	5,445	4	
7	<i>qCTB8</i>	北海PL9	RM1959～RM22430	3,229	5	
8	<i>qCTB8</i>		RM8018～RM22430	1,325	1	1

注1) 「日本晴」の塩基配列から予測される物理距離を示す。

注2) 導入領域の遺伝子型が「耐冷性供与親」型、「ひとめぼれ」型の系統数をそれぞれ示す。

(2) 耐冷性の評価

耐冷性検定圃場において、恒温深水法(松永 2005)により評価した。供試材料は、4 月中旬に播種し、5 月中旬に耐冷性検定圃場(宮城県大崎市:古川農試)に移植した。冷水処理は、7 月上旬から9 月上旬まで行い、水温は 18.5℃、水深は植物体の伸長に応じて 15cm と 25cm の 2 段階に調整した。栽植密度は、41.6 株/m²(畝間 24cm × 株間 10cm)、1 系統 3 株 2 本植、施肥は、基肥 N 成分 4kg/10a とした。1 株の上位 5 穂を 3 株から採取し、合計 15 穂の稔実率を調査した。

(3) 農業形質の評価

一般圃場(宮城県大崎市:古川農試)において、出穂期、成熟期、稈長、穂長、穂数、玄米収量、玄米千粒重、玄米品質、倒伏程度を調査した。玄米品質は、1(良)～5(不良)、倒伏程度は 0(無)～4(甚)のランクで評価した。4 月中旬播種、5 月下旬移植、栽植密度は、22.2 株/m²(畝間 24cm × 株間 15cm)、1 株 4 本植、施肥は、基肥 N 成分 4kg/10a とした。除草、病虫害防除は、慣行法により行った。葉いもちの圃場抵抗性は畑晩播法により行い、罹病葉散布で発病を促し、その後、発病程度を評価した。発病程度は、浅賀(1981)の方法により、0(発病無)～10(全茎葉枯死)の判定基準に基づいて、7 月下旬から 8 月上旬にかけて 2 回調査した。

(4) 遺伝子型解析

DNAは、Thomson and Henry (1995)の方法に従い、新鮮な葉からTPS溶液(100mM

Tris-HCl, pH8.0、10mM EDTA:エチレンジアミン四酢酸、1M KCl)により抽出し、イソプロパノールにより析出、氷冷エタノールにより精製、1/10TE溶液に溶解し、PCRに使用した。PCRは、94℃7分の後、94℃1分、55℃1分、72℃2分の35サイクル、72℃10分の反応で行い、目的DNA断片を増幅した。PCR産物は、3% (w/v) のアガロース (Sigma、Type I -A) ゲルにて電気泳動で分画し、多型を検出した。選抜に使用したDNAマーカーのプライマー塩基配列は、表2に示す。

表2 耐冷性QTLの選抜に用いたプライマーの塩基配列

QTL	マーカー名	マーカー種類	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')
<i>Ctb1, Ctb2</i>	RM17341	SSR	ACGGAGAGTACAGCCTATTTGC	ACCCTATATATCCGGTCTACGG
	RM317	SSR	CATACTTACCAGTTCACCGCC	CTGGAGAGTGTACGCTAGTTGA
	OSJN64-1	SSR	CGGCAACCAAATTTAACACC	CTGCCGGTTGATCTTGTCT
	CB3	SSR	AAGTTCAGACATGCAGCTGTGAAA	TTTCTCGCTAGCTGCTATCAGGAT
	SCAM20S	Indel	GTGAAGTACAGTTCAACACTC	TGGTGTCAATAGGTCTCGC
	RM3423	SSR	AGGCATATAAAGGTGCCCTGAGC	GTGCTTCTTTCCTCCTGTTTCAGC
	RM17488	SSR	GATGCAGATGCAAATACACACC	CTCGAAACTCGGCATACAAGC
	XAIMS5	SSR	CCCAGATCATCCAGGCATAA	ATGTCGGCGCTGGTAAACTC
	OSJN10-1	SSR	CCGGAAATTATGATGCTGCT	GGATTTCTGGGTCCGATCT
	RM17645	SSR	GCTTTGTTGGGTGATCGTCTAGG	GGCGATCTACTGTTCTTGTACACC
<i>qCTB8</i>	RM1959	SSR	CGTCGTATACTACTCCATGTATGTGC	GCTACGGAGTATACTAGGCATGAGC
	RM8018	SSR	AATTAGCTTGCAGCGGAATCACATGC	GACGGAGGGAGTAGCGATTGTGCC
	RM22430	SSR	CATCTTCTAGGGTAGGAGAAGAGC	TTCCCTCCATTGTTTACTCTCC

2) 結果

(1) 既知の耐冷性QTLである*Ctb1*、*Ctb2*、*qCTB8*を導入した「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統の耐冷性

Ctb1、*Ctb2* を単独で保有するグループ 1、2 の耐冷性検定圃場における稔実率は、「ひとめぼれ」と比べて、それぞれ 14.0%、6.0%低くなった(表 3)。*Ctb1* と *Ctb2* をともに含むグループ 4~6 は、導入領域が 3,337kbp、3,708kbp、5,445kbp と異なったが、いずれのグループも「ひとめぼれ」に比べて、それぞれ 6.4%、7.4%、0.4%低くなった。2009 年は、*Ctb1*、*Ctb2* を両方含む領域を 2,438kbp まで絞り込んだ系統と 2,438kbp の領域が「ひとめぼれ」型になった系統をともに用い、耐冷性を評価した。*Ctb1* と *Ctb2* を含む系統の稔実率は、*Ctb1* と *Ctb2* の領域が「ひとめぼれ」型になった系統に比べて、0.7%上回ったが、「ひとめぼれ」に比べると 7.6%低くなった。2010 年、2011 年の 2 カ年は、「ひとめぼれ」とのみ比較したが、いずれも 16.9、12.5%下回った。

qCTB8 を導入した「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統では、2008 年に 3,229kbp の *qCTB8* を含む領域を導入したグループ 7 の稔実率は、「ひとめぼれ」に比べて 1.5%低かった。1,325kbp にさらに絞り込んだグループ 8 の耐冷性を評価した結果、*qCTB8* を含む系統の稔実率は、2009 年は、*qCTB8* を含む 1,325kbp の領域が「ひとめぼれ」型になった系統に比べて、7.8%低く、2011 年は、「ひとめぼれ」より 0.7%低くなった。

(2) 「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統の農業形質評価

導入した QTL と不良形質の連鎖を検討するため、育成した「ひとめぼれ」準同質遺

伝子系統について主要な農業形質を評価した(表 4)。*Ctb1*、*Ctb2* を含むグループ 3 の系統と *qCTB8* を含むグループ 8 の系統において、出穂期、成熟期は、1 日以内の差で「ひとめぼれ」とほぼ同じであった。稈長は、グループ 3 が「ひとめぼれ」に比べて 3.6cm 高かったが、その他の、穂長、穂数、玄米重、倒伏程度、玄米千粒重、玄米品質については、いずれのグループも「ひとめぼれ」とほぼ同等であった。葉いもち発病程度は、グループ 3 で低くなり、いもち病圃場抵抗性が向上した。

表3「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統の耐冷性

表5「ひとめぼれ」平均遺伝伝子系統の割合												
グループ または 品種名	導入 QTL	導入 領域長 (kbp)	世代	導入領域 ^{注1)} の遺伝子型	稔実率(%)							
					2008	2009		2010		2011		
1	<i>Ctb1</i>	541	B ₄ F ₅	+	19.1±2.8 *	(n=2)						
2	<i>Ctb2</i>	1,327	B ₄ F ₅	+	27.1	(n=1)						
3	<i>Ctb1, Ctb2</i>	2,438	B ₄ F ₇ ～B ₄ F ₉	+			49.5±2.3	(n=3)	47.6±3.2 *	(n=3)	56.7±4.7	(n=3)
		2,438	B ₄ F ₇	-			48.8±4.3	(n=3)				
4		3,377	B ₄ F ₅	+	26.7±3.2 *	(n=4)						
5		3,708	B ₄ F ₄	+	25.7±3.2	(n=2)						
6		5,445	B ₄ F ₅	+	32.7±7.9	(n=4)						
ひとめぼれ					33.1±1.9	(n=3)	57.1±0.9	(n=2)	64.5±2.6	(n=2)	69.2±0.7	(n=2)
7	<i>qCTB8</i>	3,229	B ₄ F ₃	+	35.4±3.9	(n=5)						
8		1,325	B ₄ F ₅ ～B ₄ F ₆	+			45.9	(n=1)			68.5	(n=1)
		1,325	B ₄ F ₅	-			53.7	(n=1)				
ひとめぼれ					36.9±3.0	(n=2)	55.8±0.4	(n=2)			69.2±0.7	(n=2)

注1) +は、*Ctb1*、*Ctb2*は「Silewah」型、*qCTB8*は「北海PL9」型、-はともに「ひとめぼれ」型を示す。

注2) 表中の値は、平均値±標準誤差。nは系統数。

注3) *は、ひとめぼれと比較して、5%水準で有意差有。

表4 「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統の農業形質

グループ		出穂期	成熟期	穂長	穂数	倒伏程度 ^(E2)	玄米重	玄米重	玄米千粒重	玄米品質 ^(E3)	葉いもち ^(E4)			
または	系統数	世代	導入	導入領域長				比			発病程度			
品種名		QTL	(kbp)	(月・日)	(月・日)	(cm)	(cm)	(本/㎡)	(%)	(g)	(1～5)	(0～10)		
3	3	B ₄ F ₇	<i>Ctb1,Ctb2</i>	2,438	8.9 ± 0.7	9.24 ± 0.7	91.5 ± 0.9	17.7 ± 0.2	518 ± 10	1.2 ± 0.4	59.3 ± 0.7	101 ± 0.2	2.2 ± 0.2	1.4 ± 0.1
8	3	B ₄ F ₅	<i>qCTB8</i>	1,325	8.10 ± 0.3	9.25 ± 0.3	87.2 ± 1.5	18.6 ± 0.1	496 ± 14	0.5 ± 0.3	57.7 ± 2.3	98 ± 0.2	2.5 ± 0.0	5.4 ± 0.1
ひとめぼれ	-	-	-	-	8.9	9.24	87.9	18.0	493	1.0	58.9	100	2.5	5.2

注1)数値は、2009年の平均値±標準誤差を示す。

注2)倒伏程度:0(無)～4(甚)

注3)玄米品質:1(良)～5(不良)。

注4)葉いもち発病程度:0(無病斑)～10(全茎葉枯死)

3) 考察

Ctb1、*Ctb2* は「Silewah」に由来する耐冷性を持つ「水稻中間母本農 8 号」(耐冷性“極強”)と「きらら 397」(耐冷性“やや強”)の B_1F_4 集団を用いた解析により、第 4 染色体長腕に見出され、連鎖マーカーである XNpb267 座が「Silewah」型になることで、8.4%の稔実率の向上効果が確認されている(Saito et al. 1995、2001)。*qCTB8* は、「北海 PL9」(耐冷性“極強”)と「北海 287 号」(耐冷性“やや強”)の F_2 集団を用いた解析から第 8 染色体の短腕に見出され、その相加効果は 11.4%、寄与率は 26.6%と報告されている(Kuoroki et al. 2007)。北海道では、既にこれらの QTL の実用品種への導入が進んでおり、「北海 287 号」(「きらら 397」の培養変異)に *Ctb1*、*Ctb2* を導入した「北海 IL1 号」(耐冷性“強”)、*qCTB8* を導入した「北海 IL2 号」(耐冷性“強”)、「ほしのゆめ」に *Ctb1*、*qCTB8* を導入した「北海 IL3 号」(耐冷性“極強”)が育成されている。

本研究では、*Ctb1*、*Ctb2*、*qCTB8* を導入した「ひとめぼれ」の準同質遺伝子系統は、いずれも QTL 領域が「ひとめぼれ」型に置換された系統や「ひとめぼれ」より稔実率が低くなり、耐冷性の向上効果は確認されなかった。この要因は不明であるが、導入する品種の遺伝的背景や、気温等の環境条件によってその遺伝子が作用していない可能性が考えられた。「ひとめぼれ」は、「コシヒカリ」を母本、「初星」を父本とする交配により育成された品種であるが、「コシヒカリ」の穂ばらみ期耐冷性に関与する QTL である *qCT-1*、7、11 (Takeuchi et al. 2001) の 3 つの領域が、いずれも「コシヒカリ」型であることが確認されている(Shirasawa et al. 2007)。新たな耐冷性 QTL を導入する場合は、導入する品種が保有している QTL との組合せの効果を検討する必要があると考

えられる。

多様な遺伝資源から QTL を導入し、実用品種を育成していくには、付随する不良形質に留意する必要がある。「Silewah」由来の耐冷性を導入した「水稻中間母本農 8 号」の出穂期は、北海道においてやや晩生となり(安部ら 1989)、「きらら 397」に *Ctb1*、*Ctb2*を導入した系統(Saito et al. 2001)や「北海 287 号」に *Ctb1*、*Ctb2*を導入した「北海 IL1 号」、「ほしのゆめ」に *Ctb1* を導入した「北海 IL3 号」も晩生化の作用が確認されている(農業・食品産業技術研究機構作物研究所稲研究領域 2013)。この *Ctb1*、*Ctb2* の導入に伴う晩生化の要因は明らかになっていないが、本研究で育成した「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統では、晩生化の作用は観察されていないため、遺伝的背景、あるいは北海道と宮城県における環境要因の差が、この違いを生じさせているかもしれない。いずれにしろ、*Ctb1*、*Ctb2* を導入する際には、留意すべき点と考えられる。

Ctb1、*Ctb2*には、「Silewah」由来のいもち病抵抗性が付随しており、「北海 IL1 号」、「北海 IL3 号」では、未知のいもち病抵抗性遺伝子として存在が確認されている(農業・食品産業技術研究機構作物研究所稲研究領域 2013)。本研究で育成した「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統においても同様に、「ひとめぼれ」に比べて、いもち病の発病程度が低くなっていることが確認された。このいもち病抵抗性遺伝子については、まだ詳細な解析が行われていないため、不明な点が多いが、耐冷性 QTL と同時にいもち病抵抗性を付与できることは、育種上、有用な連鎖であると考えられた。

黒木ら(2011)によって、「北海 PL9」と「北海 287 号」を両親とした組換え自殖系統群

を用いて耐冷性とともに稈長や出穂期に関する解析が行われているが、*qCTB8* に連鎖する不良特性は確認されていない。本研究で育成した「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統においても、同様に不良形質は確認されておらず、*qCTB8* は他の農業形質に影響を与えない QTL であると推測された。

以上の結果から、*Ctb1*、*Ctb2*、*qCTB8* を導入した「ひとめぼれ」の準同質遺伝子系統では、耐冷性の向上効果は確認されなかった。耐冷性の QTL の効果は、導入する品種や気温等の環境条件によって変動すると考えられるため、「ひとめぼれ」の耐冷性の向上を図るには、新たな遺伝資源の探索が必要であると考えた。

第2節 ブータン品種「Kuchum」に見出された新規耐冷性 QTL の同定と耐冷性 QTL の集積効果

ブータン品種「Kuchum」は、宮城県で栽培した場合、稈長は 150cm を超え、出穂期は中生品種「ひとめぼれ」より約 1 ヶ月遅くなるため、耐冷性検定圃場を使った恒温深水法では耐冷性を評価することはできない。過去の栽培試験により冷温下でも開花時に花粉の飛散が観察されたことから、耐冷性に優れるのではないかと推測のもと、宮城県古川農業試験場では古くから耐冷性の遺伝資源として利用されてきた。実際、「Kuchum」を交配親として用いた後代から耐冷性に優れる「古川耐冷中母 106」、「東北 PL3」(遠藤ら 2013)が育成されている。しかしながら、「Kuchum」は長稈、極晩生の特性に加えて、低収や赤米等の不良形質を伴うために、実用品種を育成するのは困難であった。このことから、DNA マーカーによる選抜を利用して、耐冷性に関与するゲノム領域を導入しながら、不良形質との連鎖を取り除く方法が有効であると考えられ、「Kuchum」を用いた遺伝解析が行われてきた(未発表)。これまでの研究で、「Kuchum」の耐冷性遺伝子が第 4 染色体上にあることが推測されたため、本研究では、この QTL を *qCT-4*(QTL for Cold Tolerance at booting stage on chromosome 4)と名付け、*qCT-4* 近傍に「Kuchum」の染色体断片を導入した「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統を作成し、その領域の同定を行うとともに、準同質遺伝子系統の農業形質を評価した。さらに、中国品種「麗江新団黒谷(Lijiangxintuanheigu)」で見出された穂ばらみ期耐冷性 QTL の *qLTB3*(Shirasawa et al. 2012)と *qCT-4*をそれぞれ導入した準同質

遺伝子系統の交配を行い、両 QTL の耐冷性集積効果について検討した。

1) 材料及び方法

(1) 「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統及び QTL 解析集団の養成

ブータン品種「Kuchum」を耐冷性の供与親、「ひとめぼれ」を反復親として、6 回戻し交配を行い、*qCT-4* 近傍の領域が「Kuchum」型の 19 の遺伝子型グループ 42 系統及び、前の世代は同一系統でありながら、系統養成の過程で *qCT-4* 近傍の領域が「ひとめぼれ」型になった 26 系統の計 68 系統を育成した。各遺伝子型グループのグラフ遺伝子型は図 2 と図 3、系統数と世代は表 6、表 7 に示す通りである。

QTL 解析は、*qCT-4* 候補領域が分離する B₆F₄ 世代の 2 集団 (EBS6:78 個体、EBS8:187 個体) を用いて行った。各集団のゲノムが遺伝的に分離する領域は、EBS6 が RM5687-2(#10)～S38P21-1(#12)間、EBS8 が RM2811～20I0241(#11)間である。

(2) 集積系統の育成

(1) で育成した *qCT-4* を含む遺伝子型グループ 1 に属する系統「東 1380」と *qLTB3* を含む「羽系 1394」(のちの「奥羽 415 号」) を交配し、F₂ 個体を得た。「東 1380」は、「Kuchum」を耐冷性の供与親、「ひとめぼれ」を反復親として、6 回戻し交配を行った系統で、「羽系 1394」は、「羽系 840」に「ひとめぼれ」を戻し交配した系統で、「羽系 840」は、「麗江新団黒谷」に「ひとめぼれ」を戻し交配した系統である。「東 1380」と「羽系 1394」は、全染色体に配置する 768 の一塩基多型 (SNP) のマーカーにより遺伝子型を

解析した結果、「ひとめぼれ」との多型が、それぞれ 13 カ所(第 2 染色体 1 カ所、第 4 染色体 11 カ所、第 11 染色体 1 カ所)、5 カ所(第 3 染色体 3 カ所、第 5 染色体 1 カ所、第 8 染色体 1 カ所)と、「ひとめぼれ」とゲノム領域において同質性が高い系統である。

両系統の F_2 において、 $qCT-4$ と $qLTB3$ の遺伝子型を解析し、それぞれの QTL が「Kuchum」、「麗江新団黒谷」、「ひとめぼれ」のホモ型で固定した計 18 系統を選抜し、2 つ QTL の遺伝子型で 4 種類の遺伝子型グループを得た。グループ i は $qCT-4$:「ひとめぼれ型」、 $qLTB3$:「ひとめぼれ型」で 6 系統、グループ ii は $qCT-4$:「Kuchum」型、 $qLTB3$:「ひとめぼれ型」で 4 系統、グループ iii は $qCT-4$:「ひとめぼれ型」、 $qLTB3$:「麗江新団黒谷」型で 3 系統、グループ iv は $qCT-4$:「Kuchum」型、 $qLTB3$:「麗江新団黒谷」型の 5 系統であった。それぞれの QTL の遺伝子型解析は、 $qCT-4$ では、Indel_2(#3)、RM5687-2 (#10)、S38P21-1(#12)、 $qLTB3$ では、RM6970、RM7000、RM7389 のマーカーを用いた。

(3) 耐冷性の評価

第 1 節 1) (2)と同様に調査した。

(4) 遺伝子型解析とQTL解析

遺伝子型解析は、第1節1) (4)と同様に行った。グラフ遺伝子型の判定に使用した DNA マーカーのプライマー塩基配列は、表5に示す。

QTL解析は、連鎖地図をMapmaker/Exp Ver3.0 (Lincoln et al. 1992)により作成し、Windows QTL Cartographer ver2.5(Wang et al. 2006)により、複合区間マッピング (composite interval mapping)を行った。LODの閾値は、1,000回の並びかえ検定 (Permutation test)により、5%の有意水準で決定した。

表5 遺伝子型の判定に用いたDNAマーカーのプライマー塩基配列

マーカー名	マーカー 種類	Forward-primer (5' → 3')	Reverse-primer (5' → 3')
RM2811	SSR	AGCCTCCTACCTCTAAACCT	GCGGAGAGAGTAAGAAGTTC
RM8213	SSR	AGCCCAGTGATACAAAGATG	GCGAGGAGATACCAAGAAAG
RM3658	SSR	AGGCGAGGGTACGGATCTC	TTTCTCTCTCCTCCTTCCCC
RM4835	SSR	CGTGACCAAACTAATTATA	TGAGTATTTTCAACGTAGTC
RM7472	SSR	GCCACGTGACGGTTTAAGAG	CAAGTGGCAGTATGAGTCC
S72D08-2 (#1)	SSR	AGGGCTTCTTATTCAATTCC	AAACATGCAACTGTGGTACA
S96E05-1 (#2)	SSR	ATATGACCACGACAAAATGA	CGCAGAGATACACTGACATC
Indel_2 (#3)	Indel	GCATGCGTTTGGTTATAAGAATGGA	AACCGGCCCTGAATCCAAC TAGA
Indel_5 (#4)	Indel	AGTCCTTCCCCCTGTAGATTGTTGA	AATTTAAGAACCAAAATGGCACCAA
9_1 (#5)	SSR	TGCATATGGATCGGAGAGGAAGA	AGCCCCCTCTCCACTCGTCT
Indel_7 (#6)	Indel	TACCCAATTGCAAGATCTACCGAGA	GACACCGGATCCATCACTCAACT
Indel_9 (#9)	Indel	GTTTTTGCAATCAGTGGCAGAGTTT	ACAACTGTTTGCTGTTGGGTTTCC
RM5687-2 (#10)	SSR	GGCCCCCTAGTAGCAAGAGACATAA	GTGACTTGTGGGGTGGTTTTTGTA
10_13 (#13)	SSR	GGAGCTGCCGTAATCTACAATAG	CATACTCACAATTTGAAAATTTTG
10_14 (#14)	SSR	GGAGGCCTTAGTGTTTGAACAAGG	GGGATACACAGCTACATATGCA
20I0241-4 (#11)	SSR	CTCCAAGAAGCACACCCACTACT	AACAAGACCAAGACCAGAGCCAG
S38P21-1 (#12)	SSR	CGATGCATAGTCCACCTAAGAGT	ACTGTCATATTTCTCCCTGCAT
RM5586	SSR	AGATGGCTGGCCAACAGACTGG	ACAATGCCCATCCACTGCTTCC

(5) 農業形質の評価

食味試験は、宮城県古川農業試験場職員の試食による官能試験によった。その他の形質は、第1節 1)(3)と同様に評価した。

2) 結果

(1) 「Kuchum」の染色体断片を導入した「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統の耐冷性

*qCT-4*近傍に「Kuchum」の染色体断片を導入した「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統を作成し、導入領域によって8つの遺伝子型グループに分類し、耐冷性を評価した(図2、表6)。RM2811からS38P21-1(#12)間を「Kuchum」型で保有するグループ1は、同領域が「ひとめぼれ」型の系統や「ひとめぼれ」に比べて、2カ年とも稔実率が有意に増加した。これに対して、導入領域がRM2811からRM3658間のグループ3は、「Kuchum」型断片の有無に関わらず、稔実率に有意な差は見られなかった。その他のグループの稔実率は、「ひとめぼれ」の稔実率と比較して、グループ6、7が増加、グループ8はやや増加し、グループ2、5が低下、グループ4がやや低下する傾向が見られた。以上のことから、*qCT-4*は、S96E05-1(#2)からRM5586の約7.3Mbpに存在すると推定された。

Chr. 4

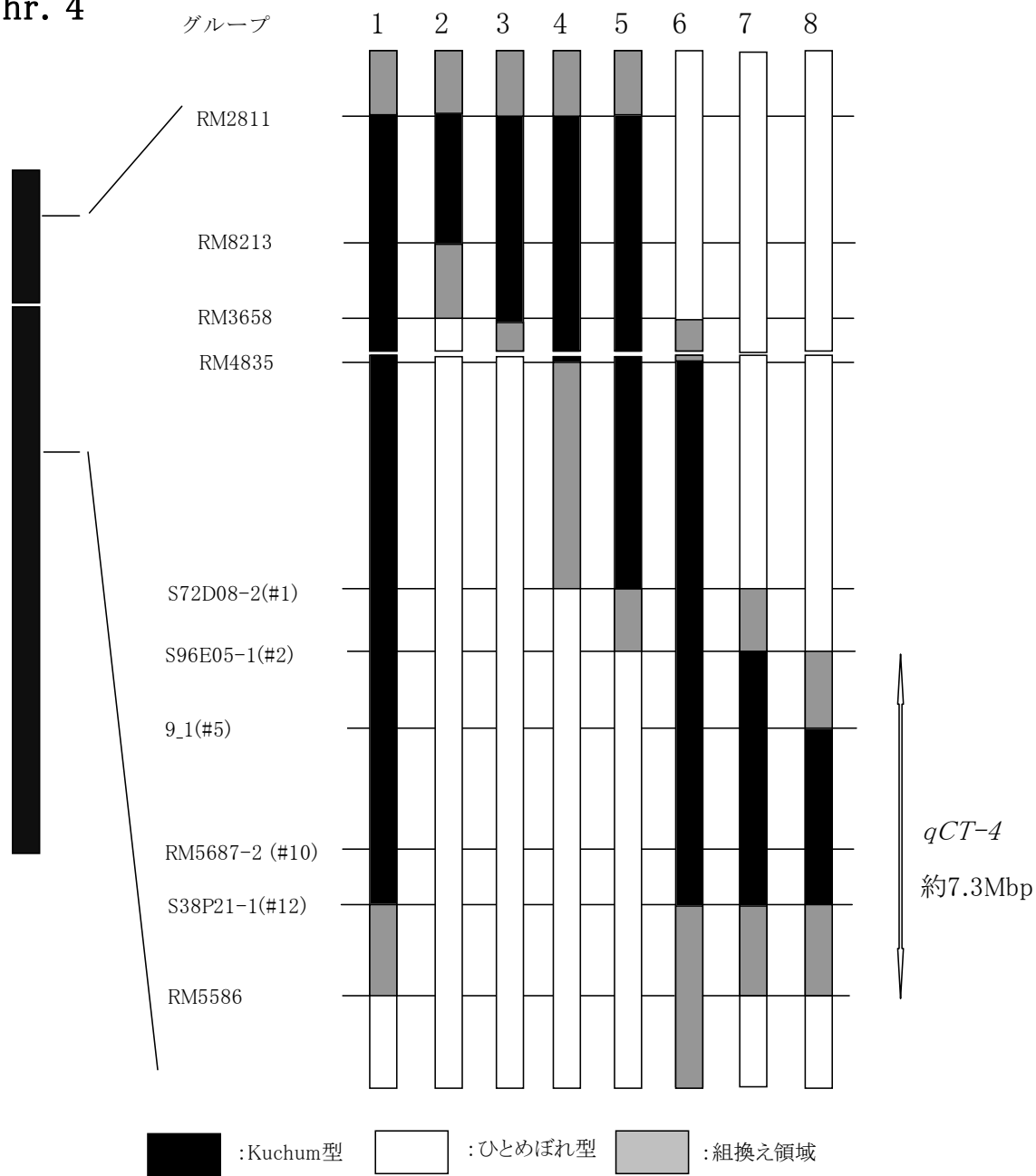


図2 「Kuchum」の染色体断片を導入した「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統
の遺伝子型

表6 「Kuchum」の染色体断片を導入した「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統の耐冷性

グループ または 品種名	導入領域	導入 ^{注1)} 領域の 遺伝子型	系統数	稔実率(%)					
				2008			2009		
1	RM2811～S38P21-1(#12)	+	7	53.3	±	2.2 **	63.4	±	1.4 **
		-	5	29.9	±	3.9	50.4	±	0.6
2	RM2811～RM8213	+	1				38.7		
3	RM2811～RM3658	+	2				51.3	±	2.1 n.s.
		-	2				47.5	±	1.9
4	RM2811～RM4835	+	1				52.3		
		-	1				54.9		
5	RM2811～S72D08-2(#1)	+	2				45.7	±	0.2
6	RM4835～S38P21-1(#12)	+	1				57.5		
		-	1				48.7		
7	S96E05-1(#2)～S38P21-1(#12)	+	3				55.3	±	3.8
		-	1				45.4		
8	9_1(#5)～S38P21-1(#12)	+	1				56.2		
		-	1				52.7		
ひとめぼれ			2	38.9	±	1.0			
			4				52.4	±	1.9

注1) +は「Kucum」型、-は「ひとめぼれ」型を示す。

注2) 数値は平均値±標準誤差。供試系統の世代は、BC₆F₃～BC₆F₄。

注3) **は、同じグループ内の導入領域の遺伝子型間で、1%水準で有意差有り、n.s.は、有意差なしを示す。

*qCT-4*近傍にグループ9から19までの導入領域が異なる新たな「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統を作出し、各グループの耐冷性を評価した(図3、表7)。グループ1、6~14、18は、2012年のグループ8と11、2013年のグループ7を除いて、「ひとめぼれ」に比べて稔実率が増加した。中でも、2011年のグループ9、2013年のグループ13と18では、「Kuchum」断片を含む系統の稔実率は、「ひとめぼれ」型に置換された系統に比べて10.5%、8.3%、3.3%高く、両者に有意な差が認められた。一方、グループ5は「ひとめぼれ」に比べて稔実率が低下し、グループ19も、2013年を除いて同様に低下した。グループ15は、「ひとめぼれ」と比べて、2011年が同等で、2012年が2.5%高く、2013年が4.2%低く、効果が判然としなかった。グループ17は、「ひとめぼれ」型に置換された系統と比較して、1.0%高かったが、有意差は認められなかった。以上の結果を総合的に判断すると、*qCT-4*は、DNAマーカーIndel_7(#6)から10_13(#13)の間、約1.0Mbの領域に存在すると推定された。

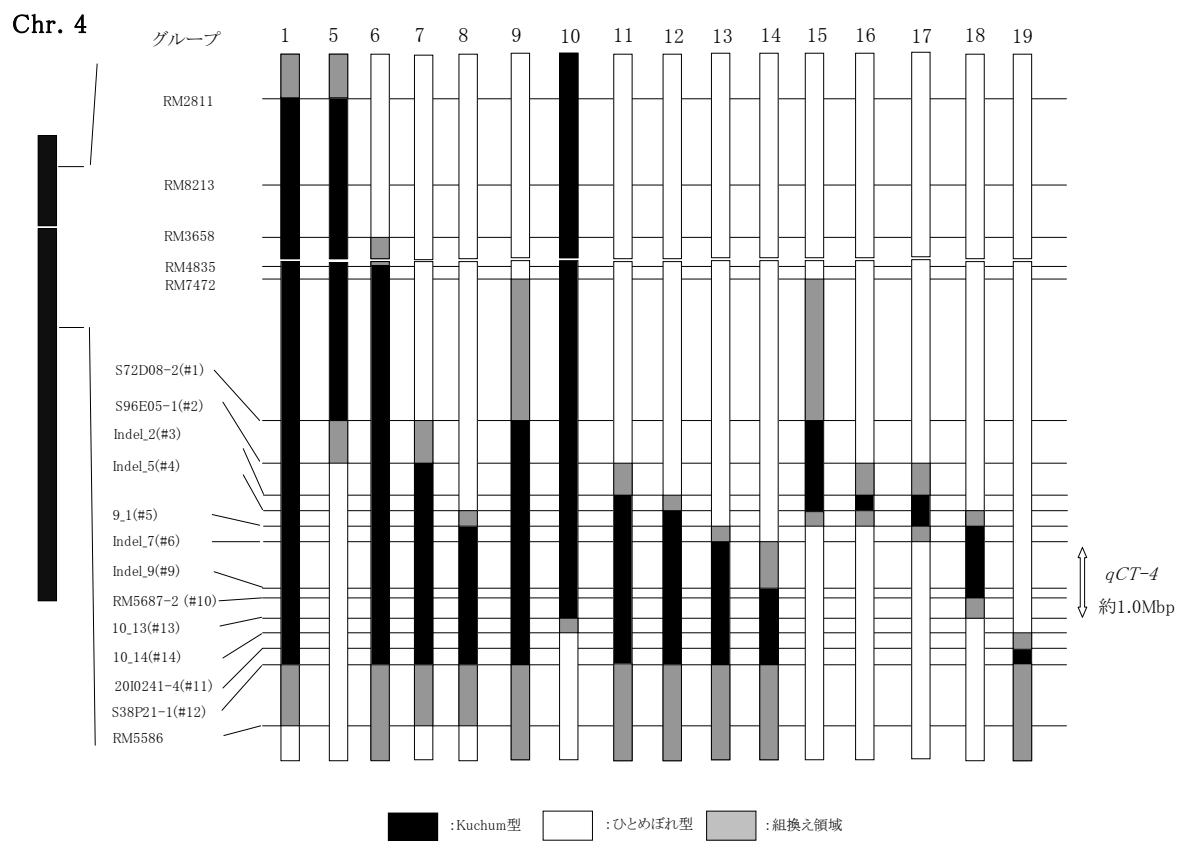


図3 「Kuchum」の染色体断片を導入した「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統
の遺伝子型

表7 「Kuchum」の染色体断片を導入した「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統の耐冷性

グループ または 品種名	導入領域	導入 ^{注1)} 領域の 遺伝子型	系統数 ^{注2)}	稔実率(%)			
				2010	2011	2012	2013
1	RM2811～S38P21-1(#12)	+	3	67.5 ± 1.8	76.2 ± 0.8	60.8 ± 1.0	76.6 ± 1.9
5	RM2811～S72D08-2(#1)	+	2	62.3 ± 0.2	60.2 ± 3.6	43.4 ± 2.4	63.7 ± 5.5
6	RM4835～S38P21-1(#12)	+	1	66.7	75.4	64.7	76.0
7	S96E05-1(#2)～S38P21-1(#12)	+	5(4)	67.5 ± 3.3	74.8 ± 0.8	61.5 ± 1.7	71.2 ± 1.8
		-	1	62.9	68.3	53.9	73.7
8	09_1(#5)～S38P21-1(#12)	+	1	70.3	75.0	51.2	71.2
		-	1	66.3	66.2	54.3	61.2
9	S72D08-2(#1)～S38P21-1(#12)	+	2(1)	70.9	78.1 ± 0.3 *	63.1 ± 0.1 n.s.	72.9 ± 4.3 n.s.
	S72D08-2(#1)～S38P21-1(#12)	-	3(2)	61.6 ± 1.1	67.6 ± 1.5	54.5 ± 2.9	65.9 ± 2.9
10	RM2811～10_13(#13)	+	1		79.0	67.5	75.4
11	10_13(#13)～S38P21-1(#12)	+	1		73.9	48.0	69.5
12	Indel_5(#4)～S38P21-1(#12)	+	1		76.2	66.4	75.6
13	Indel7(#6)～S38P21-1(#12)	+	3				72.5 ± 0.3 **
		-	3				64.2 ± 1.0
14	Indel_9(#9)～S38P21-1(#12)	+	1				75.9
15	S72D08-2(#1)～Indel_5(#4)	+	2		68.1 ± 1.0	56.2 ± 5.1	61.2 ± 13.0
16	Indel_2(#3)～Indel_5(#4)	+	3				67.6 ± 0.5 n.s.
		-	3				64.6 ± 4.2
17	Indel_2(#3)～09_1(#5)	+	3				56.2 ± 1.2 n.s.
		-	3				55.2 ± 2.3
18	09_1(#5)～RM5687-2(#10)	+	3				70.0 ± 0.6 *
		-	3				66.7 ± 0.9
19	2010241-4(#11)～S38P21-1(#12)	+	2		61.2 ± 0.3	49.3 ± 1.3	68.9 ± 4.9
ひとめぼれ		-	注2)参照	63.8 ± 1.3	68.0 ± 0.9	53.7 ± 1.7	65.4 ± 3.7

注1) +は、「Kucum」型、-は「ひとめぼれ」型を示す。

注2) 系統数の()内は、2010年の系統数。「ひとめぼれ」の系統数は、2010～2011年が5、2012年が3、2013年が6。

注3) 数値は平均値±標準誤差。

注4) *, **は、同じグループ内の導入領域の遺伝子型で5、1%水準で有意差有り、n.s.は有意差なしを示す。

注5) 供試系統の世代は、以下の通り。

グループ1:2系統(B₆F₅～B₆F₈)、2系統(B₆F₇～B₆F₁₀)。グループ5、6、8:B₆F₅～B₆F₈。グループ7:4系統(B₆F₅～B₆F₈)、2系統(2010年は1系統)(B₆F₇～B₆F₁₀)。グループ9:B₆F₇～B₆F₁₀。グループ10～12:B₆F₈～B₆F₁₀。グループ13、14、16、17:B₆F₉。グループ18:B₆F₁₀。

(2) *qCT-4*候補領域の分離集団によるQTL解析

RM5687-2 (#10) ～ S38P21-1 (#12)間が分離した集団(EBS6)では、稔実率において、閾値を超えるLODのピークがRM5687-2 (#10)の位置で検出された(表8)。稔実率に関する遺伝効果は、相加効果6.509、優性効果3.716、寄与率は28.5%であった。

RM2811 ～ 20I0241-4 (#11)間が分離した集団(EBS8)では、稔実率では、EBS6と同様に、RM5687-2 (#10)において閾値を超える有意なLODのピークが検出され、その遺伝効果は、相加効果6.311、優性効果1.837、寄与率19.6%であった。到穂日数ではRM2811において閾値を超えるLODのピークが検出され、その遺伝効果は、相加効果-0.798、優性効果0.290、寄与率は5.7%であった。稈長については、EBS6、EBS8ともに有意なQTLは検出されなかった。

以上のことから、耐冷性に関するQTLである $qCT-4$ は、耐冷性の表現型全分散に占める20～30%の分散をRM5687-2の遺伝子型で説明することができ、この領域が「ひとめぼれ」型から「Kuchum」型に置換されることにより、12.6～13%の稔実率を向上させる効果があることがわかった。また、到穂日数については、RM2811座が「Kuchum」型に置換されることにより、1～2日早くなる効果があることがわかった。

表8 $qCT-4$ 候補領域の分離集団におけるQTL解析

集団名	世代	分離領域	形質	LOD最大の 遺伝子座	相加効果	優性効果	寄与率 (%)	LOD最大値
EBS6	B ₆ F ₄	RM5687-2～S38P21-1 (#12)	稔実率(%)	RM5687-2 (#10)	6.509	3.716	28.5	5.672
EBS8	B ₆ F ₄	RM2811～20I0241-4 (#11)	稔実率(%)	RM5687-2 (#10)	6.311	1.837	19.6	8.839
			到穂日数(日)	RM2811	-0.798	0.293	5.7	2.394

注) 相加効果は、「Kuchum」型アレルの効果を示す。

(3)「Kuchum」の染色体断片を導入した「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統の農業形質

*qCT-4*を含む「Kuchum」の染色体断片をもち、耐冷性が優れていたグループ1に属する2系統(東1380、東1381)、グループ8に属する1系統(東1489)について、耐冷性以外の農業形質を調査した(表9)。グループ1の2系統で出穂期が1～2日早く、3系統ともに稈長がやや短めであったが、その他の穂長、玄米重、玄米千粒重、玄米品質、倒伏程度、食味については、ほぼ同程度であった。特に、グループ8の「東1489」は、「ひとめぼれ」との同質性が高かった。

表9 qCT-4を導入した「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統の農業形質

品種	出穂期	成熟期	稈長	穂長	穂数	玄米 重	同左 対比	玄米 千粒重	玄米 ^{注2)} 品質	倒伏 ^{注3)} 程度	食味 ^{注4)} (総合)
または 系統名	グループ	(月・日)	(月・日)	(cm)	(cm)	(本/m ²)	(kg/a)	(g)	(1～5)	(0～4)	
東1380	1	8. 5	9.18	81	18.4	457	58.6	22.2	2.8	1.6	0.54
東1381	1	8. 6	9.18	81	18.0	469	59.6	21.9	2.6	1.7	0.69
東1489	8	8. 7	9.18	80	18.4	457	57.5	22.4	2.3	1.3	0.81
ひとめぼれ	-	8. 7	9.19	83	18.6	471	59.6	22.3	2.5	1.6	0.81

注1) 数値は2009、2011～2012年の3年平均。世代は、B₆F₄～B₆F₅、B₆F₇。

注2) 玄米品質:1(良)～5(不良)。

注3) 倒伏程度:0(無)～4(甚)。

注4) 基準品種(げんきまる)を0としたときの2012年の評価:-:(不良)～+:(良)。

(4) 集積系統の耐冷性評価

*qCT-4*と*qLTB3*をそれぞれ導入した準同質遺伝子系統同士を交配し、その $F_3 \sim F_4$ 世代の18系統について、耐冷性を評価した(表10)。*qCT-4*と*qLTB3*が共に「ひとめぼれ」型の F_3 世代であるグループ i の稔実率が55.2%であったのに対して、*qCT-4*、*qLTB3*を単独で導入したグループ ii、iiiは、それぞれ66.2%、72.7%、となり、グループ i に比べて耐冷性の有意な向上効果が認められた。2つのQTLを導入したグループ ivも、グループ i に比べて有意な耐冷性の向上を示し、グループ ii、iiiとは有意差は認められなかったものの、稔実率がグループ ii よりも9.3%、グループ iii よりも2.8%増加した。この傾向は、 F_4 世代でも同様に認められた。

表10 耐冷性QTL集積系統の耐冷性

グループ	耐冷性QTL ^{注1)}		系統数 n	2012				2013			
	<i>qCT-4</i>	<i>qLTB3</i>		稔実率 (%)	標準 誤差	注2)		稔実率 (%)	標準 誤差	注2)	
i	-	-	6	55.2	± 2.9	a		67.0	± 2.1	a	
ii	+	-	4	66.2	± 1.6	b		78.4	± 1.3	b	
iii	-	+	3	72.7	± 2.0	b		81.5	± 0.5	b	
iv	+	+	5	75.5	± 1.7	b		82.5	± 1.1	b	
東1380	+	-	1	51.5				76.9			
奥羽415号	-	+	1	65.3				80.5			
ひとめぼれ	-	-	1	66.3				72.6			

注1) +は、*qCT-4*は「Kuchum」型、*qLTB3*は「麗江新団黒谷」型、-はともに「ひとめぼれ」の遺伝子型を表す。

注2) 異なる符号間で5%水準で有意差有 (Tukey-Kramer法)。

3) 考察

「Kuchum」の染色体断片が導入された「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統の評価により、*qCT-4*はIndel_7(#6)から10_13(#13)の間、約1.0Mbpの領域に存在すると推測された。第4染色体上に既に報告されているQTLとしては、第1節で述べた*Ctb1*、*Ctb2* (Saito et al. 1995)や、*qCTB4-1*、*2* (Xu et al. 2008a)があるが、「日本晴」の塩基配列 (IRGSP build5 :<http://rgp.dna.affrc.go.jp/E/IRGSP/Build5/>) で比較すると、*Ctb1*、*Ctb2*は第4染色体上のRM17341～RM17645間の28.8～35.1Mbpに、*qCTB4-1*はRM518～RM6700間の約2.0～2.8Mbpに、*qCTB4-2*はRM7200～RM8213間の約4.0～4.4Mbpに位置することから、約15.3～16.3Mbpに位置している*qCT-4*とは異なると考えられた。したがって、*qCT-4*は、新規の穂ばらみ期耐冷性に関するQTLであると考えられた。B₁F₄を用いた解析から、このQTLの効果は、相加効果6.3～6.5%、寄与率19.6～28.5%で、優性の効果が推定された。実際、*qCT-4*を「ひとめぼれ」に導入した準同質遺伝子系統では、稔実率の向上効果は約10%程度であり、見出された相加効果を概ね反映している効果であった。

*qCT-4*を導入した「ひとめぼれ」の準同質遺伝子系統は、いずれも収量性や食味といった「ひとめぼれ」の優良な特性をほぼ維持していた。このことから、*qCT-4*は、近傍に付随する不良形質を持たず、「ひとめぼれ」遺伝背景で有効なQTLと考えられた。グループ1の「東1380」と「東1381」の出穂期が、「ひとめぼれ」に比べて1～2日早かったが、B₆F₄のQTL解析により見出された到穂日数に関するQTLがRM2811付近にあるためと考えられ、実際、RM2811の領域が取り除かれているグループ8の「東1489」は、

出穂期が「ひとめぼれ」とほぼ同等であった。今後、耐冷性に関する多数のQTLの集積を図っていく上では、たとえ作用が小さいQTLであっても、個々のQTLの農業形質への影響は把握しておくべき情報である。

耐冷性に関与する QTL は、相加効果が 10%未満となることが多く (Takeuchi et al. 2001、Xu et al. 2008a、黒木ら 2011)、単一ではその効果は小さい。本研究で検出した *qCT-4* も、その相加効果は 6.4%と同様に小さかった。このことから、耐冷性を飛躍的に向上させるためには、いくつかの QTL を集積していく必要がある。*qLTB3* は、Shirasawa et al. (2012) によって、中国品種「麗江新団黒谷」と「ひとめぼれ」の戻し交配系統後代の遺伝解析によって、第 3 染色体長腕末端部に見出された穂ばらみ期耐冷性に関する QTL である。*qCT-4* と *qLTB3* の集積系統の稔実率を調査した結果、個々の QTL の効果は確認できたが、その集積系統では、個々の QTL を導入した系統よりも高い稔実率を示したものの有意差は見られなかった。用いた耐冷性検定条件 (18.5℃) では、集積効果が明確に表れなかった可能性が考えられる。黒木ら (2011) も、「北海 PL9」より見出した *qCTB8*、*qCTB1.1*、*qCTB1.2* の QTL 間において、相加的な効果が得られることを報告しているが、明瞭な集積効果は得られていない。

以上の結果から、「Kuchum」由来の穂ばらみ期耐冷性に関する QTL である *qCT-4* は、「ひとめぼれ」の遺伝背景下で、約 10%の稔実率向上効果があり、その領域は、第 4 染色体長腕の Indel_7(#6)から 10_13(#13)の間の約 1.0Mbpの領域に存在することが明らかになった。*qCT-4* は既に報告されている「麗江新団黒谷」由来の穂ばらみ期耐冷性 QTL である *qLTB3* とともに導入することで、さらに耐冷性が向上する可能性が期

待される。今後、「ひとめぼれ」の耐冷性向上を図っていくには、*qCT-4* や *qLTB3* のような「ひとめぼれ」遺伝背景下で効果のある QTL を探索し、集積を図っていくことが重要である。そのためには、新規遺伝資源の耐冷性 QTL を導入するにあたり、 F_2 の遺伝解析などの予備試験により、その導入品種の遺伝背景や栽培地域の環境条件下で QTL の効果を確認し、さらに QTL に不良な農業形質の連鎖がないことを確認して利用することが重要であると考えられた。

第Ⅲ章 白葉枯病抵抗性と密接に連鎖したいもち病圃場抵抗性遺伝子の候補領域 の同定

第1節 白葉枯病抵抗性遺伝子 *Xa1-as(t)* と連鎖したいもち病圃場抵抗性遺伝子 *Pias(t)* の候補領域の絞り込み

「あそみのり」は、熊本県と九州農業試験場(現、九州沖縄農業研究センター)による共同育種事業(1967～1972)において、1973年に育成された水稻粳品種であり(杉谷ら 1976)、白葉枯病に対して高度な圃場抵抗性を示すことが知られている(茂木ら 1981)。その抵抗性を構成する遺伝子の一つとして、*Xa1* 座の *Xa1-as(t)* が知られている(Ise 1998)。*Xa1-as(t)* は、I 群菌とV群菌に対して、幼苗期、成苗期ともに抵抗性を示すため、幼苗期に不安定な抵抗性を示す *Xa1* とは異なると推定される。また、*Xa1* を保有する「あさかぜ」、「黄玉」の抵抗性が崩壊したのに対して、*Xa1-as(t)* を保有する「あそみのり」の抵抗性は、20 年以上抵抗性を示している。さらに、*Xa1-as(t)* は、粳や玄米をフェノール溶液に浸漬すると黒褐色を呈するフェノール着色反応遺伝子 *Ph* と 2.4%の組換え価で密接に連鎖しているとされている。一方、日本の一部の育種家の間では、「あそみのり」を交配親として用いることで、後代から白葉枯病抵抗性だけでなく、いもち病抵抗性に優れる系統が得られることが経験的に知られていたが、その遺伝子の存在については不明であった。(独)農業・食品産業技術総合研究機構・東北農業研究センター(以降、東北農業研究センターと略す)では、「あそみのり」の交配後代か

らいもち病圃場抵抗性に優れる系統を得た。本研究では、これらの系統を用いて、「あそみのり」が保有する白葉枯病抵抗性遺伝子といもち病圃場抵抗性遺伝子の関係を明らかにするとともに、「あそみのり」が保有するいもち病抵抗性遺伝子を *Pias(t)* と名付け、その候補領域を見出すことを目的とした。なお、本研究では、穂いもち(穂くびいもち、穂軸いもち、枝梗いもち、ミゴいもち、靱いもち、護穎いもち)は対象としていないため、以降、いもち病圃場抵抗性と示した場合、葉いもちに対する圃場抵抗性をさすものとする。

1) 材料及び方法

(1) 供試材料

a) 「あそみのり」の戻し交配系統と *Pias(t)* 近傍組換え系統の育成

1997 年に「おきにいり」と「あそみのり」の交配を行い、翌年、「おきにいり」を反復親とする戻し交配を実施した。「おきにいり」はいもち病圃場抵抗性のレベルが“やや強”、白葉枯病の I 群菌(菌株 T7174)に対しては罹病性である。その後、いもち圃場抵抗性検定により、いもち病圃場抵抗性に優れる 5 系統を選抜し固定を図り、「羽系 851」、「羽系 852」、「羽系 854」(のちの「奥羽 411 号」)、「羽系 856」、「羽系 857」の 5 系統(2004 年世代: B_1F_6)を得た。

2006 年に「羽系 854」と「ひとめぼれ」の交配に由来する F_3 系統に「ひとめぼれ」を交配し、 F_1 種子を得た。 F_1 種子の自殖によって得られた 826 の F_2 個体から YX4-3 と NX4-1 の間に 2 種類の組換え個体を得て、これらの組換え固定系統からそれぞれ 4

系統と 3 系統を養成し、グループ 1、2 とした。同様に 826 の B_1F_2 個体から RM5511 と RM5709 の間が「ひとめぼれ」ホモ型、「あそみのり」ホモ型である個体からそれぞれ 3 系統を養成し、グループ 4、5 とした。また、「羽系 854」と「ひとめぼれ」の交配に由来する F_3 系統に「ひとめぼれ」を戻し交配することにより、 B_1F_1 世代 20 個体を得て、RM1250 と YX4-1 間で組換えを生じた 3 系統を選抜し、これをグループ 3 とした(以上、図 4)。

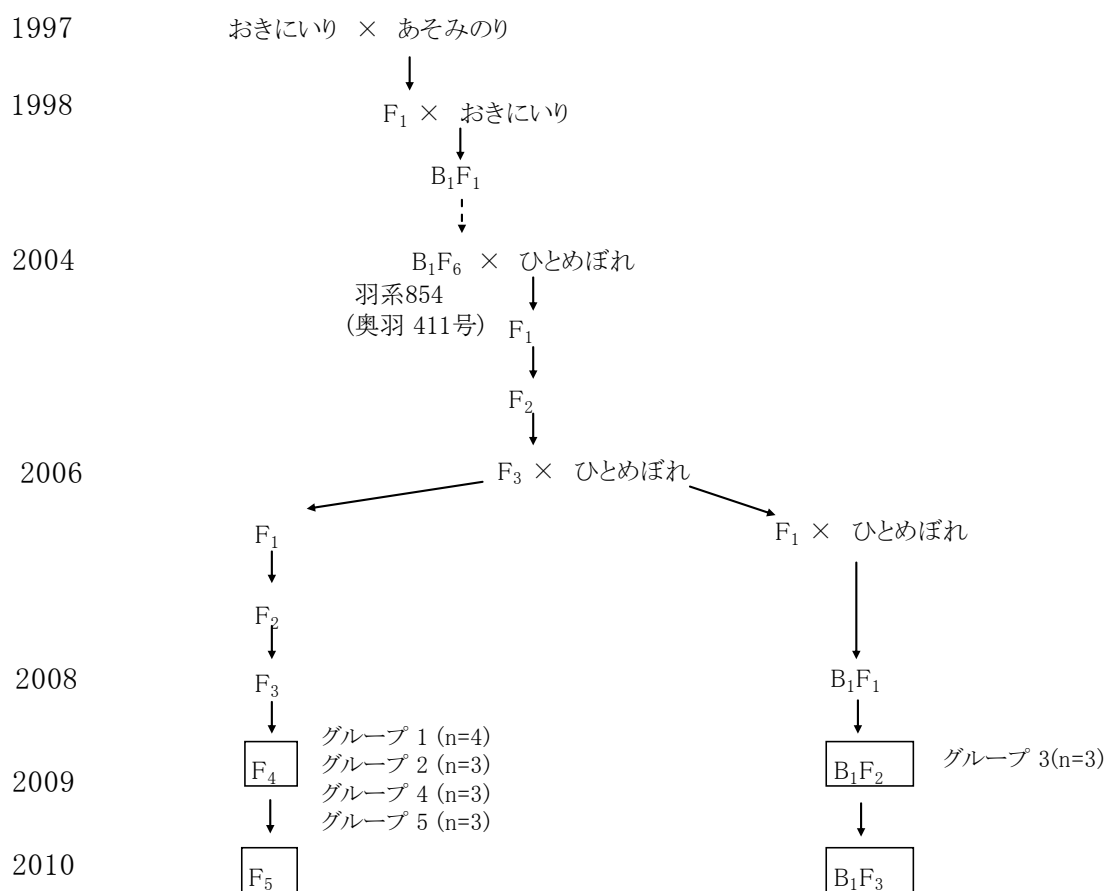


図 4 「あそみのり」の戻し交配系統と *Pias(t)*近傍組換え系統の育成経過

b) 遺伝解析の交配後代の養成

2004 年に「羽系 854」(あそみのり/おきにいり//おきにいり、2004 年世代: B_1F_6)と「ひとめぼれ」の交配を実施した。「羽系 854」は、いもち病圃場抵抗性のレベルが“強”、白葉枯病の I 群菌(菌株 T7174)に対しては抵抗性であり、一方、「ひとめぼれ」は、それぞれ“やや弱”と罹病性である。その後、 F_1 より得られた F_2 世代から 118 個体を無作為に選抜し、2005 年に F_2 個体由来の 118 系統(2006 年世代: F_3)を得て、遺伝解析に供試した。

(2) いもち病圃場抵抗性の検定

いもち病圃場抵抗性は、2006 年、2007 年と 2009 年は東北農業研究センター(秋田県大仙市)、2010 年は宮城県古川農業試験場(宮城県大崎市)の試験圃場にて、畑晩播法(東・小綿 1995)により自然発病条件下において評価した。各品種及び系統の種子約 100 粒を、1 試験区あたり、長さ 20~35cm の播種床に、幅 5cm の間隔で 6 月上旬に播種した。2006 年、2009 年は 2 反復、2007 年、2010 年は 3 反復で行った。試験区の周囲には発病を促進するため、罹病性品種「イナバワセ」(2010 年は「54 系 3110」)を栽植し、自然発病条件で検定を行った。発病程度は、浅賀(1981)の方法により、0(無病徴)~10(全茎葉枯死)の判定基準に基づいて、7 月下旬から 8 月上旬にかけて 2~3 回調査した。

(3) 白葉枯病抵抗性の検定

白葉枯病抵抗性検定用のイネは、試験圃場(2006 年:秋田県大仙市(東北農業研究センター)、2009 年:宮城県大崎市(宮城県古川農業試験場))に 1 系統あるいは 1 品種あたり 10 株(2009 年:15 株)、栽植密度 29.6 本/m²(畝間 22.5cm×株間 15cm)、1 株 1 本植で 5 月下旬に移植した。施肥は、基肥が窒素成分で 4.0kg/10a(2009 年は 7.0 kg/10a)、追肥は、発病を助長させるため、幼穂の形成期間に窒素成分で 2.0kg/10a の 3 回行った。白葉枯病菌は、出穂の約 1 週間前に剪葉接種法(小川・関沢 1980)により、止葉に I 群菌(菌株 T7174)を接種した。接種 2~3 週間後に、接種部位におけるクロロシスの病徴進展の有無で感受性と抵抗性を評価した。遺伝解析で行った F₃ 世代の評価は、調査した 5 個体全てでクロロシスが観察された系統は罹病性、観察されなかった系統は抵抗性とし、罹病性と抵抗性の個体が両方観察された系統は、分離系統(ヘテロ)と判定した。

(4) フェノール着色反応

1 系統 3 粒の粃を 1.5%(v/v)フェノール溶液に 3 時間浸漬後、風乾して反応の有無を観察し、黒色に変化したものを陽性、変化が生じなかったものを陰性と判定した。

(5) 遺伝子型解析

遺伝子型解析は、第 2 章第 1 節 1) (4)と同様に行った。組換え系統の選抜に用いた DNA マーカーを表 11 に示す。

表11 組換え系統の選抜に用いたDNAマーカーのプライマー塩基配列

マーカー名	マーカー 種類	アニーリング 温度	制限酵素	プライマー塩基配列		物理位置 (IRGSP build 5)
				上流領域(5' → 3')	下流領域(5' → 3')	
RM5503	SSR	55		GGGAAGAAGATAGGAGATGG	CTCTGGGTACACTTCACGAG	30862787-30862968
RM5511	SSR	61		GAGCTCCGACAGAAACAC	ACATCGAGGTGAGCGAGC	31612065-31612273
RM3534	SSR	55		TTGAGCTTCGTCTACAAGCG	CAGCTCCACCATCTCTCTC	31663255-31663364
RM1250	SSR	55		GAAACACGACTAGGCATCG	CTTCCACAAGGTCTCGCTTC	31761297-31761445
YX4-1	SSR	60		ATGATACGGGCTCCGAAATA	CGTGGGTGCAATTCACTCTT	31883730-31883917
YX4-2	CAPS	60	<i>Hae</i> III	TTGAGTCTTGCCCTCGTGTCT	GTCTTTGCACACGAAACCAATT	31894231-31893413
YX4-3	CAPS	60	<i>Hha</i> I	CTGAGCAGAAAGGCCAAGAAG	GCAGCTGTAAGCAAGTCATCC	31975409-31976293
YX4-4	CAPS	60	<i>Msp</i> I	GATTACGAAACCTCTGCCTGGT	TATGAGTGGGCCAACAAACTG	32012541-32011805
YX4-5	Indel	60		GACGAGGCGATGTGTCAATGT	AGGGAGTTCAAGGTGGACTTATTCTA	32109924-32110078
NX4-1(あそみのり特異的プライマー)	アレル特異的プライマー (ひとめぼれ, おきにいり特異的プライマー)	65		ATTGCGGATTAGGAACGTCAAT	AGTGCGTGTGGGCGTGTGG	32136847-32137149
RM5473-2		55		GGACACTTACATGTTGGTTCCATAATT	AGTGCGTGTGGGCGTGTGG	32136765-32137149
RM3843	SSR	55		ACCACAAACGATCGCGTC	GAGATTAACTGTCGTCTCCG	32175685-32175809
RM6629	SSR	55		ACCCTACTCCCAACAGTCCC	GGGTGCGTACGCTCATGTC	32182810-32182963
RM3836	SSR	50		TAAACGGTGTGCAGCTTCTG	TATTATGGGCGGTGCGCTAAC	32243825-32243890
RM5709	SSR	55		ACTGTGGAGTACAGGTCGGC	GAAACGGAAACGAAACCCCTC	32310745-32310851
	SSR	55		AAGTACTCTCCCGTTTCAAA	CCTCCCATAAAAAATCTTGTC	32559997-32559852

2) 結果

(1) 「あそみのり」の交配後代のいもち病圃場抵抗性と白葉枯病抵抗性

東北地方では、*Pia*、*Pii*、*Pik* のような真性抵抗性遺伝子に対して親和性である 007 や 037 のレースが優占している(善林ら 2002)。そのため、いもち病圃場抵抗性の評価に用いる基準品種は、真性抵抗性遺伝子型別にグループ A (*Pik-s*、*Pia*)、グループ I (*Pii*、*Pia* & *Pii*)、グループ K (*Pik*、*Pia* & *Pik*) の 3 つのグループに分類され、グループ毎に圃場抵抗性のレベルに基づいて、“極強”、“強”、“やや強”、“中”、“やや弱”、“弱”、“極弱”とランク付けされている(Kataoka et al. 2004)。「あそみのり」と「羽系 851」は *Pia*、「おきにいり」と「羽系 852」、「羽系 854」、「羽系 856」、「羽系 857」は *Pia* と *Pii*、「ひとめぼれ」は *Pii* と判定されたため、それらの基準品種との比較に基づいて、いもち病圃場抵抗性を評価した(図 5)。基準品種の発病程度は、*Pia* の“極強”にランクされる「奥羽 320 号」は 3.7、*Pii* で“強”の「中部 45 号」は 5.0 であった。さらに、代表的ないもち病圃場抵抗性品種である *Pik-s* の「中部 32 号」や *Pia* の「戦捷」の発病程度は、それぞれ 3.2 と 1.3 であった。「あそみのり」、「羽系 854」及びその他の交配後代のいもち病発病程度は、それぞれ 3.7、3.5、2.8 であった。これに対して、交配後代の反復親である「おきにいり」や参考品種の「ひとめぼれ」の発病程度は、それぞれ 6.2、7.0 であった。これらの結果から、「あそみのり」の交配後代の発病程度は、「戦捷」の発病程度より高いものの、「奥羽 320 号」や「中部 45 号」等の“極強”、あるいは“強”の基準品種の発病程度と同程度かそれよりも低かった。

白葉枯病の I 群菌(菌株 T7174)を接種して「あそみのり」の交配後代と「ひとめぼ

れ」の白葉枯病抵抗性検定を行ったところ、「あそみのり」とその交配後代では、クロロシスは観察されなかったが、「ひとめぼれ」においては、止葉葉身の先に明確なクロロシスが確認された。その結果、「あそみのり」とその交配後代は抵抗性、「ひとめぼれ」は罹病性であることがわかった。

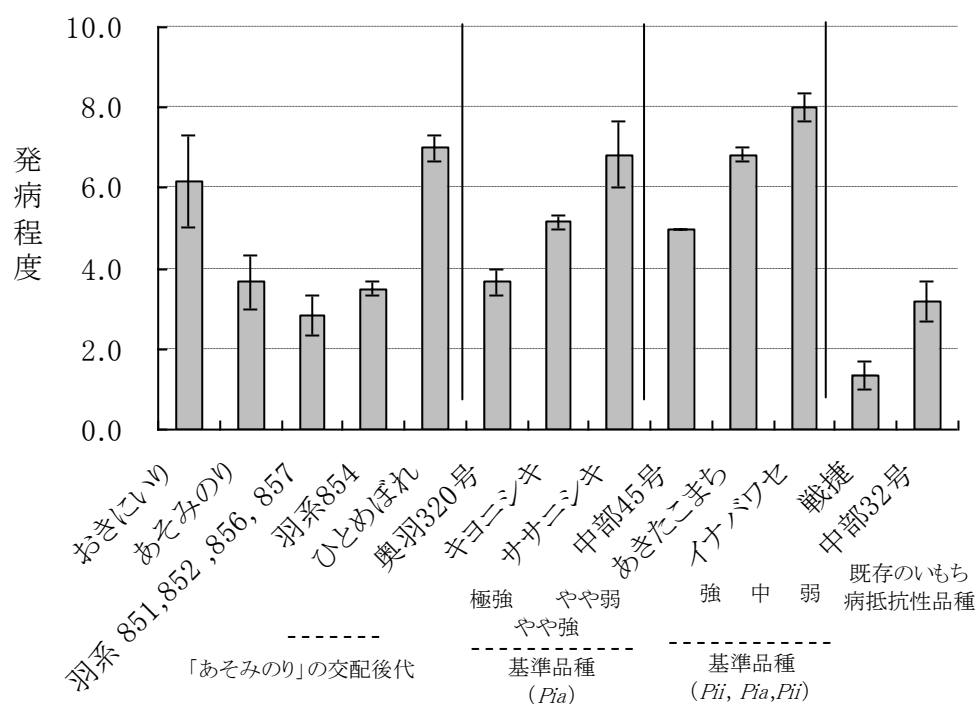


図5 「あそみのり」の交配後代におけるいもち病発病程度

いもち病発病程度は、0(無病徴)から 10(全茎葉枯死)。品種あるいは系統毎のエラーバーは、標準誤差を示す。「羽系 851、852、854、856、857」の交配組合せ:おきにいり/あそみのり//おきにいり。

(2)「あそみのり」の交配後代のグラフ遺伝子型

「あそみのり」が保有している白葉枯病抵抗性遺伝子 *Xa1-as(t)* が、第 4 染色体に座乗するフェノール着色反応遺伝子と連鎖しているという Ise (1998) の報告に基づいて、第 4 染色体の遺伝子型を調査した。その結果、交配後代の 5 系統が共通して「あそみのり」型対立遺伝子を持つ染色体領域を RM5511 から YX4-5 の領域に見出した (図 6)。この共通領域は、第 4 染色体の長腕に位置しており、「日本晴」の物理距離に基づき、そのサイズは 1,336 kbp である推定された。この共通領域にいもち病抵抗性と白葉枯病抵抗性遺伝子 *Xa1-as(t)* が座乗していると推測された。

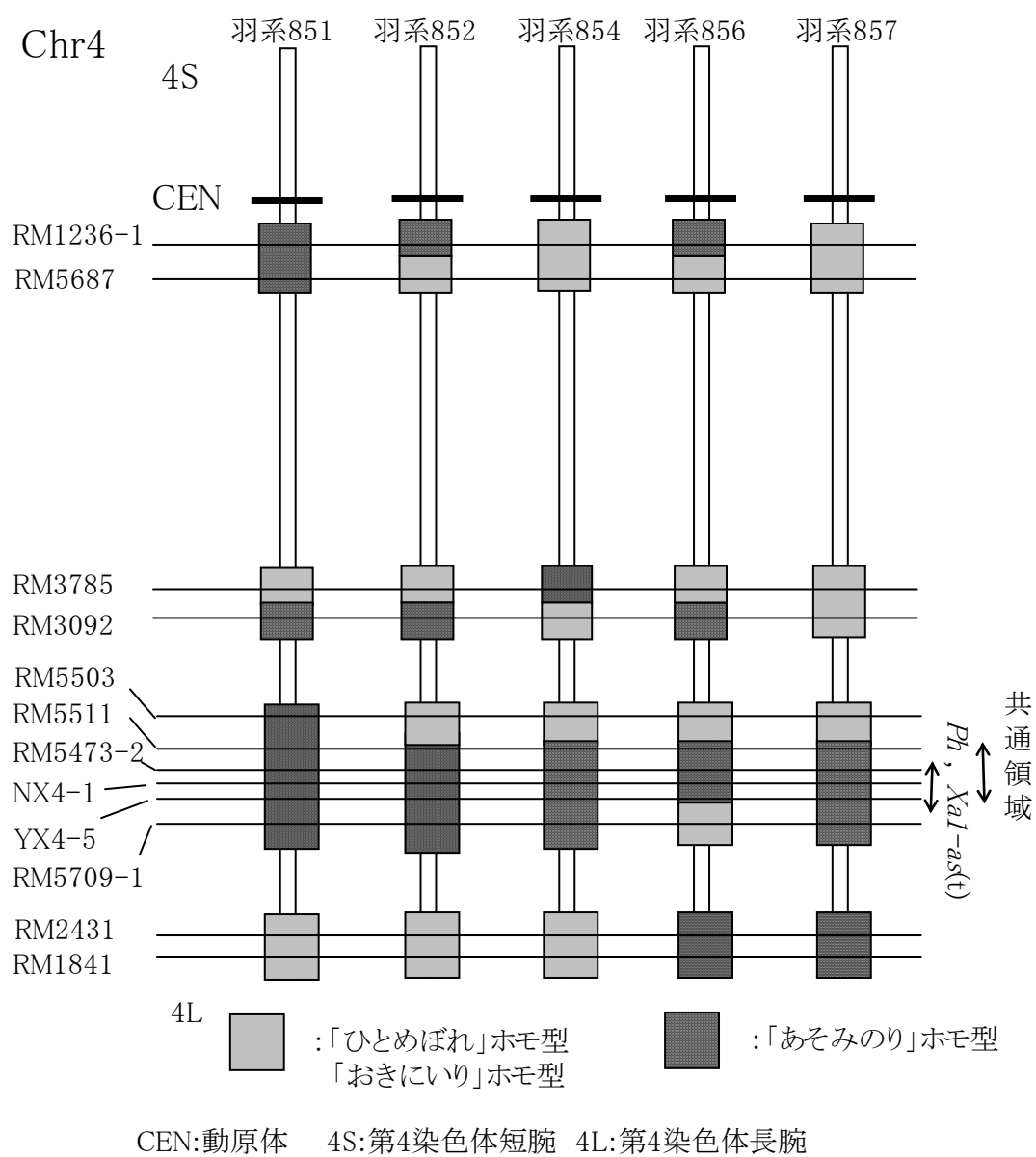


図6 「あそみのり」の交配後代のグラフ遺伝子型

(3) F_3 系統のいもち病圃場抵抗性の頻度分布

「あそみのり」の交配後代である「羽系 854」と「ひとめぼれ」の F_3 世代 118 系統のいもち病圃場抵抗性と白葉枯病抵抗性を評価した。 F_3 系統の葉いもちの発病程度は 2.3 ~8.3 の範囲で連続的に分布した(図 7-a、b)。それぞれの系統を、白葉枯病 I 群菌(菌株 T7174)に対して抵抗性の系統と罹病性の系統、分離系統(ヘテロ)の 3 グループに分類した結果、白葉枯病菌に罹病性であった F_3 系統の平均発病程度は 6.0 で、抵抗性であった系統の平均発病程度は 4.0 となった(図 7-a)。両者の差は、1%水準で有意であった。

F_2 世代の RM5473-2 の遺伝子型に基づいて、 F_3 系統を「あそみのり」ホモ型、「ひとめぼれ」ホモ型、ヘテロ型の 3 つのタイプに分類したいもち病発病程度の頻度分布を図 7-b に示す。RM5473-2 は、(2)において「あそみのり」の交配後代 5 系統に見出された染色体の共通領域に位置する DNA マーカーの一つである(図 6)。RM5473-2 の遺伝子型が「ひとめぼれ」ホモ型であった系統のいもち病の平均発病程度は 6.1 であるのに対して、「あそみのり」ホモ型であった系統の平均発病程度は 3.9 であった。両者の間には、1%水準で有意差が認められた。以上のことから、「あそみのり」のいもち病圃場抵抗性遺伝子と白葉枯病抵抗性遺伝子 *Xa1-as(t)* 及び RM5473-2 は、密接に連鎖している可能性が示唆された。

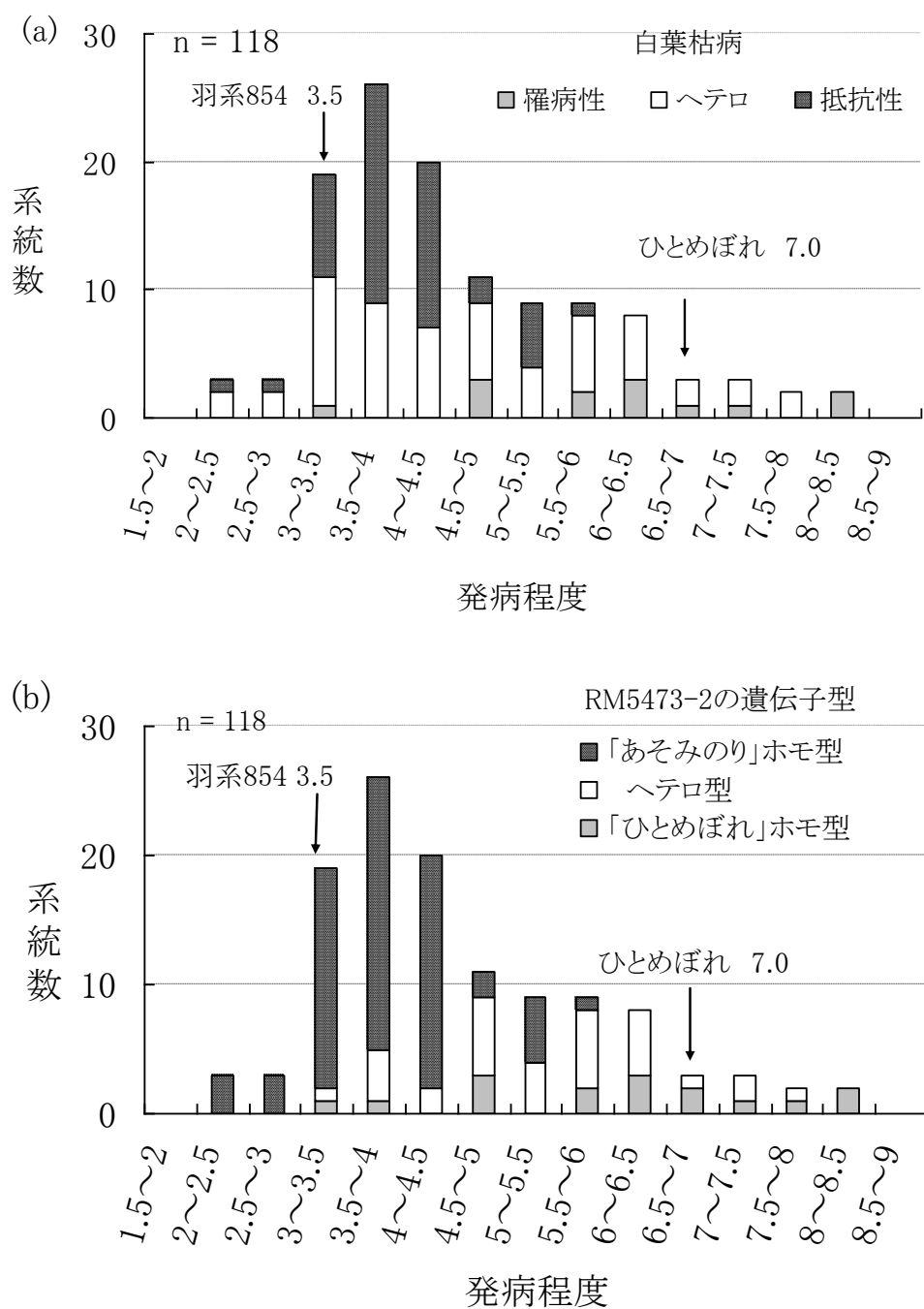


図 7 羽系 854／ひとめぼれの交配後代(世代:F₃)における

いもち病発病程度の頻度分布

(a)白葉枯病抵抗性の罹病の有無で分類した頻度分布

(b)前世代(F₂)における RM5473-2 の遺伝子型で分類した頻度分布

(4) *Pias(t)* 近傍の組換え系統のグラフ遺伝子型

Pias(t) の詳細な位置や、白葉枯病抵抗性遺伝子 *Xa1-as(t)* と連鎖であるかを明らかにするため、*Pias(t)* 近傍の組換え系統を作成し、*Pias(t)* の詳細な位置について絞り込みを行った。供試系統は、第 4 染色体長腕における RM5511～RM5709 間の 15 種類の DNA マーカーで 5 種類の遺伝子型に分類された(図 8)。グループ 1～3 では、RM5511 からグループ RM5709 の間で組換えを生じ、グループ 4、5 は、RM5511 から RM5709 間が全て「ひとめぼれ」ホモ型、あるいは「あそみのり」ホモ型の遺伝子型を示すものである。各グループの系統数は、グループ 1 が 4、グループ 2～5 がそれぞれ 3 系統であった。この領域は、「奥羽 411 号」の反復親である「おきにいり」は「ひとめぼれ」ホモ型、「奥羽 411 号」は「あそみのり」ホモ型であり、日本晴のゲノム情報から推定されるこの領域の物理距離は、約 948kbp であった。

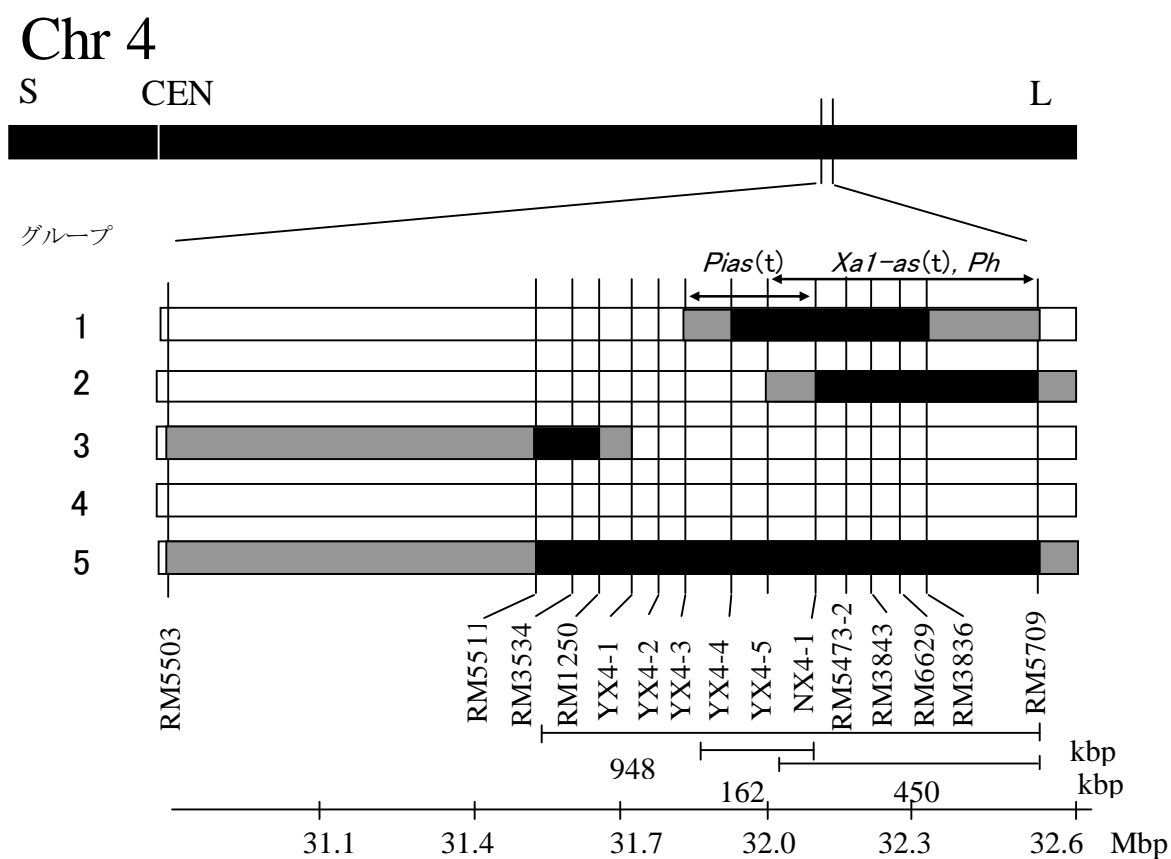


図 8 第 4 染色体上の $Xa1-as(t)$ 、 Ph 、 $Pias(t)$ の座位

グループ 1～5 のカラムは、それぞれ黒:「あそみのり」、白:「ひとめぼれ」の染色体断片を表し、灰色は組換え領域であることを示す。DNA マーカー間の物理距離は、「日本晴」のゲノム配列より推定した。図中のアルファベットは、それぞれ Chr4:第 4 染色体、CEN:動原体、L:長腕、S:短腕 を表す。

(5) *Pias(t)*近傍の組換え系統のいもち病圃場抵抗性と白葉枯病抵抗性

2009 年と 2010 年の 2 年平均のいもち病発病程度は、反復親である「ひとめぼれ」で 5.6 と高く、いもち病圃場抵抗性遺伝子の供与親である「あそみのり」は 3.8、「奥羽 411 号」が 3.4 と低かった(図 9)。組換え系統の発病程度は、グループ 1 や 5 で 3.7、3.8 と低く、グループ 2 や 3 で 5.1、4.7 と高かった。RM5511 から RM5709 までは全て「ひとめぼれ」型であるグループ 4 を対照として、その他のグループと発病程度を比較すると、グループ 4 とグループ 1 や 5 の間には、2009 年、2010 年ともに 1%水準で有意差が認められた(Dunnett 法)。グラフ遺伝子型といもち病圃場抵抗性の発病程度から判断すると、「あそみのり」が保有するいもち病圃場抵抗性遺伝子 *Pias(t)*は、YX4-3 と NX4-1 の間の約 162kbp の間に位置すると推定された。また、グループ 4 と 5 の発病程度の比較により、*Pias(t)*はホモ接合でいもち病の発病程度を 1.2 低下させる作用力があることがわかった。

組換え系統及び「ひとめぼれ」、「あそみのり」、「奥羽 411 号」の白葉枯病抵抗性は、「ひとめぼれ」とグループ 3 や 4 でクロロシスの病徴が進展し、罹病性の反応を示したが、「あそみのり」、「奥羽 411 号」及びグループ 1、2、5 は、接種の切り口が褐変化した、クロロシスの病徴は示さず、抵抗性反応を示した(表 12)。*Ph* 着色反応については、「ひとめぼれ」とグループ 3 や 4 が陰性を示し、「あそみのり」、「奥羽 411 号」及びグループ 1、2、5 は、陽性を示した(表 12)。このことから、*Xa1-as(t)*と *Ph* 着色反応遺伝子は、YX4-5 から RM5709 の間約 450kbp に座乗すると推定された。グループ 2 のように、白葉枯病に対しては抵抗性であるが、いもち病の発病程度が高い系統があることから、

「あそみのり」のいもち病圃場抵抗性と白葉枯病抵抗性は、一遺伝子による多面発現ではなく、白葉枯病抵抗性遺伝子 *Xa1-as(t)* といもち病圃場抵抗性遺伝子 *Pias(t)* が連鎖関係にあることが明らかになった。

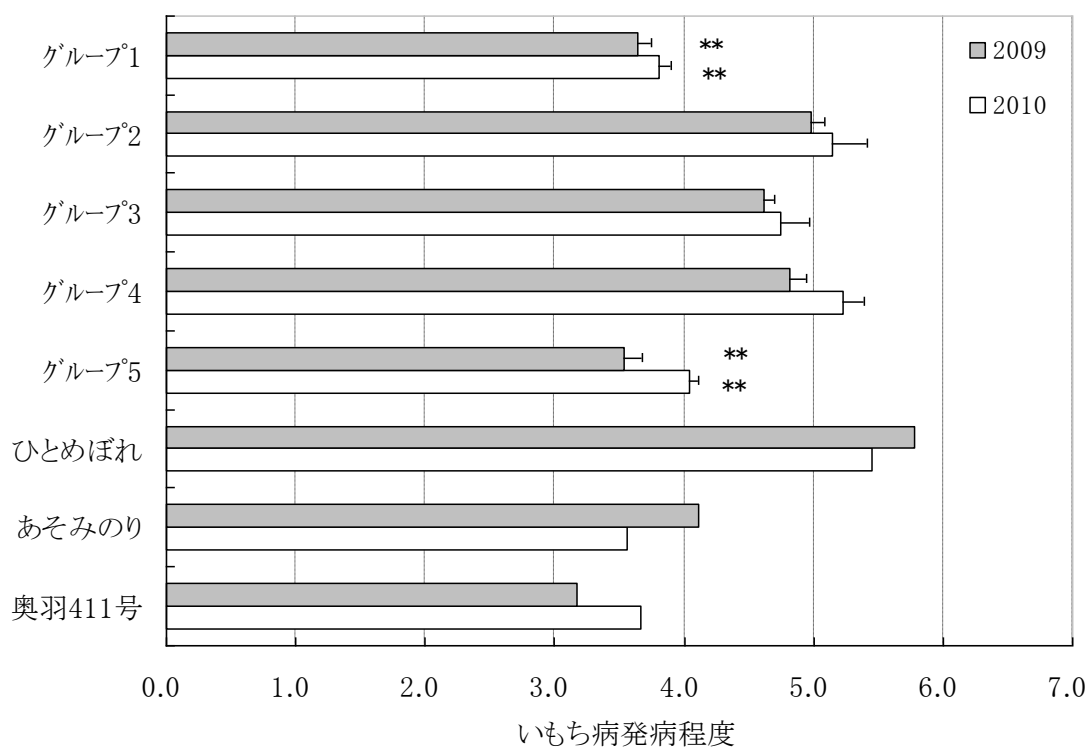


図 9 *Pias(t)*近傍組換え系統におけるいもち病発病程度

灰色と白のカラムは、2009年の秋田県大仙市、2010年の宮城県大崎市におけるいもち病の発病程度を示す。エラーバーは、標準誤差を示す。アステリスクは、グループ 4 と1%水準で有意 (Dunnnett 法)であることを示す。

表12 *Pias*(t)近傍組換え系統における白葉枯病抵抗性とフェノール着色反応

形質	グループ番号 または 品種・系統名							
	1	2	3	4	5	ひとめぼれ	あそみのり	奥羽411号
白葉枯病抵抗性 ^{注1)}	R	R	S	S	R	S	R	R
フェノール着色反応 ^{注2)}	+	+	—	—	+	—	+	+

注1) I 群菌(菌株T7174)の剪葉接種法による検定。R:抵抗性、S:感受性を表す。

注2) 粃を1.5%(v/v)のフェノール反応液に浸種して、3時間後に観察。+:陽性、-:陰性反応を表す。

3) 考察

いもち病圃場抵抗性遺伝子として、*pi21* (Fukuoka et al. 2009)、*Pb1* (Hayashi et al. 2010)、*Pi9* (Qu et al. 2006)、*Pi34* (Zenbayashi et al. 2007)、*Pi35* (Nguyen et al. 2006)、*Pi40* (Jeung et al. 2007)、*Pikahei-1(t)* (Miyamoto et al. 2001、 Xu et al. 2008b)、*Pi39(t)* (Terashima et al. 2008)などが報告されている。これらのいもち病圃場抵抗性遺伝子のうち、*Pias(t)*が座乗する第 4 染色体長腕の領域には、*Pikahei-1(t)*と *Pi39(t)*が位置している。*Pikahei-1(t)*は、陸稻の在来品種「嘉平」から見出され、DNA マーカー RM17496 と RM6629 の間 300 kbp に位置している。*Pi39(t)*は、「中部 111 号」(のちの「みねはるか」)から見付き、その由来は中国品種「毫乃煥 (Haonaihuan)」とされ、その位置は、DNA マーカー RM5473 と RM3843 とそれぞれ 0.3、1.0cM の組換え価で位置するとされている。これらのことから、*Pias(t)*は、*Pikahei-1(t)*の候補領域内 300kbp に含まれ、*Pi39(t)*の候補領域と重なっていると推測される。「嘉平」と「みねはるか」は、白葉枯病菌 I 群菌(菌株 T7174)に対してそれぞれ罹病性と抵抗性であり、*Ph* 着色反応はともに陰性である。「あそみのり」、「嘉平」及び「毫乃煥」には、系譜的な関連性がなく、いずれの遺伝子も特定されていないため、これらが同一であるという可能性は否定できない。品種育成の面では、連続戻し交配により「コシヒカリ」に *Pikahei-1(t)*を導入した「ひたち IL1 号」が既に育成されており、*Pi39(t)*は「みねはるか」が品種として普及を開始しているとともに、いもち病抵抗性を改良するための育種母本としての利用が進んでいる。今後、これらの遺伝子の同定が進めば、これらの遺伝子構造や機能の相違が明らかになると期待される。

「IR24」が保有する白葉枯病抵抗性遺伝子 *Xa1* は、病原菌の初期応答に関係する代表的な病害抵抗性遺伝子の構造である NBS-LRR 配列を保有していることが明らかになっている(Yoshimura et al. 1998)。ゲノム上の病害抵抗性遺伝子を網羅的に解析した結果によると、*Xa1* 座が座乗する第 4 染色体の長腕付近は、NBS-LRR 配列の密集領域であることが報告されている(Monosí et al. 2004)。本研究では、*Pias(t)*の候補領域を、DNA マーカーを使ったファインマッピングにより「日本晴」の塩基配列にして約 162kbp の領域まで絞り込んだ。RAP-DB (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>)によると、この DNA マーカー YX4-5 から NX4-1 までの領域には 25 の遺伝子が座乗しており、*Xa1* のホモログを含む少なくとも 3 つの病害抵抗性に関わるタンパク質の遺伝子が関連づけられている。今後、これら遺伝子を中心に解析を進めることによって、近い将来 *Pias(t)*が単離されることが考えられる。

第2節 いもち病圃場抵抗性遺伝子 *Pias(t)*の由来と他の農業形質評価

第1節で「あそみのり」のいもち病圃場抵抗性遺伝子 *Pias(t)*が第4染色体長腕のDNA マーカーYX4-3 とNX4-1 の間の約162kbp の間に位置すると推定された。この領域には、中国品種「毫乃煥(Haonaifhan)」由来の *Pi39(t)*(Terashima et al. 2008)や日本陸稲在来種「嘉平」由来の *Pikahei-1(t)*(Xu et al. 2008b)が報告されているが、これらの品種の系譜的な接点はなく、関連性は不明である。また、*Pias(t)*は、*Xa1-as(t)*と密に連鎖しているため、いもち病圃場抵抗性と白葉枯病抵抗性を同時に品種に導入でき、これまでも「みやこ 95」(西山ら 1992)のような「あそみのり」を交配母本とした後代からいもち病圃場抵抗性と白葉枯病抵抗性に優れる実用品種が育成されており、不良形質の連鎖の影響が少なく有用な遺伝子であると考えられた。

本研究では、「あそみのり」が保有する第4染色体上のいもち病抵抗性遺伝子 *Pias(t)*の系譜上の祖先にあたる品種、系統のいもち病圃場抵抗性や遺伝子型分析による抵抗性遺伝子の由来についての検討と、育成過程で得られた「羽系 854」(のちの「奥羽 411 号」)の農業形質の評価による *Pias(t)*の実用性についての検討の結果を示す。

1)材料及び方法

(1)供試材料

「あそみのり」の系譜上にある品種または系統である「西海 85 号」、「西海 59 号」、「幸

風」、「Pi No.2」、「十石」、「全勝 26 号」、「Tadukan」及び「千本旭」の種子は、(独)農業生物資源研究所ジーンバンクより入手した。

(2)いもち病圃場抵抗性、白葉枯病抵抗性、*Ph* 着色反応、遺伝子型分析

第 1 節(2)～(5)と同様に調査した。

3)「奥羽 411 号」の実用性評価

一般圃場(秋田県大仙市:東北農業研究センター)において、2006～2009 年にかけて、出穂期、成熟期、稈長、穂長、穂数、玄米収量、玄米千粒重及び玄米品質を調査した。玄米品質は、外観や白未熟粒の発生程度により、1(良)～9(不良)で評価した。4 月下旬播種、5 月下旬移植、栽植密度は 22.2 株/m²(畝間 30cm×株間 15cm)で、1 株 3 本植で栽培し、施肥は、基肥 N 成分 7 kg/10a、追肥 N 成分 2 kg/10a とした。除草と病虫害防除は、慣行法により行った。食味は、東北農業研究センター職員の試食により官能試験を実施して、1(上上)～9(下下)で評価した。

耐冷性は、恒温深水法により検定した。葉いもちの圃場病抵抗性は畑晩播法による発病程度、穂いもちの圃場抵抗性は、罹病苗の移植や罹病穂の設置により発病誘導した試験圃場における発病程度により調査した。

2) 結果

(1) *Pias(t)* の由来

「あそみのり」は、「西海 85 号」と「西海 59 号」の F₁ に「幸風」を交配した 3 系交配による育成品種である(図 10)。「西海 85 号」は、いもち病と白葉枯病にともに抵抗性を示し、フェノール着色反応は陽性であったが、「西海 59 号」と「幸風」は両病害に罹病性で、フェノール着色反応は陰性であった(表 13)。このことから *Pias(t)*、*Xa1-as(t)*、*Ph* 着色反応遺伝子は、「西海 85 号」に由来するものと考えられた。「西海 85 号」は、「PiNo.2」、「十石」、「全勝 26 号」の 3 系交配により育成された(図 10)。「PiNo.2」は、いもち病抵抗性を示したが、白葉枯病抵抗性は罹病性でフェノール着色反応は陰性であった。「十石」と「全勝 26 号」は、いもち病の発病程度が高く、白葉枯病抵抗性も罹病性で、フェノール着色反応は陰性であった(表 13)。

「あそみのり」の両親では、「西海 85 号」のみが、DNA マーカーで「あそみのり」と同じ遺伝子型であった。*Pias(t)* は「西海 85 号」の染色体由来であることが推測されたが、「西海 85 号」の親である「PiNo.2」、「十石」、「全勝 26 号」が、YX4-3 と RM5709 間のすべての DNA マーカーの遺伝子型が、「ひとめぼれ」型であった。したがって、本研究の結果からは、*Pias(t)* の由来は「西海 85 号」までは同定できたが、その先の由来は明らかにすることができなかった。

表13 「あそみのり」の系譜上の品種または系統の表現型とDNAマーカー遺伝子型

品種・系統名 /特性またはDNAマーカー ^{注4)}	西海85号	西海59号	幸風	Pi No.2	十石	全勝 26号	Tadukan	千本旭
いもち病発病程度 ^{注1)}	1.0 ± 0.5	4.3 ± 0.4	5.3 ± 0.2	1.7 ± 0.2	5.2 ± 0.4	5.0 ± 0.3	0.0 ± 0.0	3.8 ± 0.3
白葉枯病抵抗性 ^{注2)}	R	S	S	S	S	S	R	S
Ph ^{注3)}	+	-	-	-	-	-	-	-
YX4-3	A	H	H	H	H	H	A	H
YX4-4	A	H	H	H	H	H	H	H
YX4-5	A	H	H	H	H	H	A	H
NX4-1	A	H	H	H	H	H	-	H
RM5473-2	A	H	H	H	H	H	A	H
RM3843	A	H	H	H	H	H	A	H
RM6629	A	H	H	H	H	H	C	H
RM3836	A	H	H	H	H	H	A	H
RM5709	-	H	H	H	H	H	-	H

注1)数値± 標準誤差は、いもち病の発病程度(0(無病徴)～10(全茎葉枯死))を表す。

注2) I 群菌(菌株T7174)の剪葉接種法による検定。R:抵抗性、S:感受性を表す。

注3)初を1.5%のフェノール反応液に浸種して、3時間後に観察。+:陽性、-:陰性反応を表す。

注4)各DNAマーカーによる遺伝型を表す。A:「あそみのり」型、H:「ひとめぼれ」型、C:その他の遺伝子型。 -:増幅しない。

(2) *Pias(t)*と *Xa1-as(t)*を保有する「奥羽 411 号」の農業実用形質

「奥羽 411 号」は、出穂期、成熟期は、「あきたこまち」より2～3 日遅く、「ひとめぼれ」より2 日程度早く、育成地(秋田県大仙市)では、“中生の中”の熟期に分類された。稈長、穂長は「あきたこまち」よりやや長く、「ひとめぼれ」と同程度、倒伏程度は、両品種に比べてやや優った。玄米千粒重は24.8gと「あきたこまち」や「ひとめぼれ」と比べて2～3g 大きく、玄米収量はそれぞれ、「あきたこまち」対比 106%、「ひとめぼれ」対比 100%であった。玄米品質は、両品種に比べてやや劣り、食味は同程度であった。いもち病抵抗性については、葉いもち、穂いもちともに抵抗性であった。

表14 「奥羽411号」の農業形質

品種・系統名	出穂期 (月・日)	成熟期 (月・日)	稈長 (cm)	穂長 (cm)	穂数 (本/m ²)	倒伏 程度 ^{注2)} (0～5)
奥羽411号	8.4 ±1.4	9.17 ±2.5	86 ±2.5	19.1 ±0.2	366 ±21.8	0.2 ±0.2
あきたこまち	8.2 ±1.6	9.14 ±2.6	83 ±3.1	18.0 ±0.2	419 ±32.8	0.9 ±0.5
ひとめぼれ	8.6 ±1.4	9.19 ±2.6	87 ±3.0	18.8 ±0.2	484 ±33.7	1.3 ±0.5

注1) データは、2004～2009年の6年の平均±標準誤差を示す。

注2)倒伏程度は、0(倒伏無)～5(完全倒伏)を示す。

品種・系統名	玄米	玄米	玄米	玄米	いもち病圃場抵抗性 ^{注5)}	
	収量	収量比	千粒重	品質 ^{注3)}	食味 ^{注4)}	
	(kg/a)	(%)	(g)	(1-9)	(1-9)	
奥羽411号	61.3 ±3.3	106	24.8 ±0.4	4.6 ±0.3	2	3
あきたこまち	57.9 ±3.3	(100)	21.6 ±0.3	3.8 ±0.3	2	6
ひとめぼれ	61.5 ±2.4	106	22.5 ±0.3	3.9 ±0.2	2	6

注3)玄米品質は、光沢や白未熟粒の発生程度により評価し、上上(1)～下下(9)で表す。

注4)食味は、炊飯米の官能試験により評価し、上上(1)～下下(9)で表す。

注5)いもち病圃場抵抗性は、1(抵抗性)～9(罹病性)で評価した。

3) 考察

「あそみのり」の *Pias(t)* と *Xa1-as(t)* が「西海 85 号」由来であり、YX4-3 と RM5709 間の遺伝子型は、「西海 85 号」の親である「PiNo.2」、「十石」、「全勝 26 号」のすべてが「ひとめぼれ」型であるため、「西海 85 号」の *Pias(t)* の由来は不明であった。「西海 85 号」は、「十石」と「全勝 26 号」の F_1 に「PiNo.2」を交配して育成された系統である。「PiNo.2」は、フィリンピン品種「Tadukan」に「千本旭」を戻し交配することにより育成された系統であり、兄弟系統である「PiNo.1」は、遺伝解析により「ヤシロモチ」と同じ *Pita* を保有することが明らかになっている(清沢 1969)。「西海 85 号」も *Pita* を保有していることから、「PiNo.1」と同様に「PiNo.2」も「Tadukan」由来の *Pita* を保有していると考えられる。「西海 85 号」、「PiNo.2」及び「Tadukan」のいもち病発病程度が低かったのは、*Pita* の効果であると考えられる。「十石」は 1930 年頃から九州地方の筑後平野で栽培されていた在来種で、短稈で倒伏に強く、収量性に優れる多収品種であるが、白葉枯病、いもち病、萎縮病、紋枯病などの病害に弱いことが知られている。1953 年に九州農業試験場(現九州沖縄農業研究センター)では、「十石」の白葉枯病抵抗性と品質の改良を目的に、「十石」を母、白葉枯病抵抗性である「全勝 26 号」を父とする人工交配が行われ、その後代から「ホウヨク」(いもち病抵抗性(葉): 中位、白葉枯病抵抗性: 中位)、「コクマサリ」(いもち病抵抗性(葉): 中位、白葉枯病抵抗性: 優れる)、「シラヌイ」(いもち病抵抗性(葉): 中位、白葉枯病抵抗性: やや優れる)が育成されている(岡田 1966)。本研究の結果と、これらの事実から、「西海 85 号」の先の系譜上で、「十石」が *Pias(t)* の起源ではないことが推察される。本研究で用いた「全勝 26 号」は、白葉

枯病抵抗性に罹病性であったが、白葉枯病抵抗性親として利用されており、同一品種名で系統が混在している可能性が考えられる。

本研究で用いた「奥羽 411 号」は、*Pias* (t) と *Xa1-as*(t)を導入したことで、両病害抵抗性が向上し、その他の農業形質も「あきたこまち」や「ひとめぼれ」等の既存品種と同等であった。「奥羽 411 号」は、2010 年に「きんのめぐみ」として品種登録が出願され、現在、秋田県と長野県で産地品種銘柄に設定され、普及が開始されている(梶ら 2013)。この他にも「あそみのり」を交配親とする組合せから、「ニシヒカリ」、「トヨコガネ」、「みやこ 95」、「ヨカミノリ」及び「南海 119 号」等が育成されている。特に、「ミヤコ 95」(西山ら 1992)や「ヨカミノリ」、「南海 119 号」は、「あそみのり」と同様に、いもち病とともに白葉枯病抵抗性にも優れている。「あそみのり」は、交配母本として利用することで、いもち病と白葉枯病に対する抵抗性の向上に役立ち、抵抗性を導入した系統や品種の農業形質に実用上問題となるような不良形質は確認されず、実用性が高いと考えられた。

第Ⅳ章 耐冷性といもち病抵抗性を導入した「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統 の農業形質評価

耐冷性を高める QTL である *qCT-4* と *qLTB3*、*Ctb1*、*Ctb2* 近傍の「Silewah」由来の
いもち病抵抗性遺伝子、「あそみのり」に由来するいもち病圃場抵抗性遺伝子 *Pias(t)*、
また既に報告されているいもち病圃場抵抗性遺伝子 *Pi39(t)* (Terashima et al. 2008)、
Pi35(t) (Nguyen et al. 2006)、*Pi34* (Zenbayashi et al. 2007) 及び *Pb1* (藤井ら 1999a)
を導入した「ひとめぼれ」の準同質遺伝子系統を育成し、耐冷性といもち病抵抗性の
向上効果とその他の農業形質の評価を行った。

1) 材料及び方法

(1) 供試材料

「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統の耐冷性 QTL 及びいもち病圃場抵抗性遺伝子の
導入親は、*qCT-4* が「Kuchum」、*qLTB3* が「麗江新団黒谷」、*Pi39(t)* が「みねはるか」、
Pi35(t) は「ゆきのはな」、*Pi34* は「中部 32 号」、*Pb1* は「中部 105 号」、*Pias(t)* は「あそみ
のり」、*Ctb1*、*Ctb2* に近傍のいもち病抵抗性は「Silewah」である。

「東 1489」は「Kuchum」を 1 回親、「ひとめぼれ」を 6 回戻し交配した系統で、第Ⅱ章
の図 2、3 のグループ 8 に属する系統である。「13P-701」～「13P-705」の 5 系統は「東
1380」と「羽系 1394」、「13P-706」～「13P-710」の 5 系統は「羽系 1394」と「東 1384」の
交配による育成系統である。「東 1380」は、「Kuchum」を 1 回親、「ひとめぼれ」を 6 回

戻し交配をおこなった系統で、第Ⅱ章の図2、3のグループ1に属する系統である。「東 1384」は、「Silewah」を1回親、「ひとめぼれ」を5回戻し交配をおこなった系統で、「羽系 1394」は、「羽系 840」に「ひとめぼれ」を戻し交配した系統で、「羽系 840」は、「麗江新団黒谷」に「ひとめぼれ」を戻し交配した系統である(以上、表 15)。「東 1380」、「東 1384」、「羽系 1394」は、全染色体に配置する 768 の一塩基多型(SNP)のマーカースにより遺伝子型を解析した結果、「ひとめぼれ」との多型が、それぞれ 13 カ所(第 2 染色体 1 カ所、第 4 染色体 11 カ所、第 11 染色体 1 カ所)、5 カ所(第 1 染色体 2 カ所、第 2 染色体 1 カ所、第 4 染色体 2 カ所)、5 カ所(第 3 染色体 3 カ所、第 5 染色体 1 カ所、第 8 染色体 1 カ所)と、「ひとめぼれ」とゲノム上の同質性が高い系統である。

「13P-711」～「13P-713」と「13P-715」「13P-716」の 5 系統は、「みねはるか」に「ひとめぼれ」を3回戻し交配した系統である「09EL110-4」に、「ひとめぼれ」を戻し交配した系統である。「13P-717」は「中部 32 号」に「ひとめぼれ」を3回戻し交配した系統である「09EL111-2」に、「ひとめぼれ」を戻し交配した系統である。「13P-718」と「13P-719」の 2 系統は、「ゆきのはな」に「ひとめぼれ」を3回戻し交配した系統である。「13P-720」～「13P-727」の 8 系統は、「羽系 835」に「ひとめぼれ」を3回戻し交配した系統である「09EL113-1」に、「ひとめぼれ」を戻し交配した系統である。「羽系 835」は、「奥羽 371 号」と「中部 105 号」の交配後代である。「11P-412」は、「羽系 854」と「ひとめぼれ」の交配後代である「06AH35-4」に「ひとめぼれ」を戻し交配した系統で、「羽系 854」は、「あそみのり」に「おきにいり」を戻し交配した系統であり、第Ⅲ章の図 8 のグループ 1 に属する系統である(以上、表 15)。

「13P-711～713」、「13P-715」～「13P-727」の16系統は、DNA マーカーによるMAS (Marker Assisted Selection) と交配を繰り返しながら育成した(図 11、図 12)。MAS に使用した DNA マーカーは表 16 の通りで、*Pi35(t)* の選抜に使用した DNA マーカー P33685 (配列非公開) は、(独) 農業・食品産業技術総合研究機構中央農業総合研究センター安田伸子氏より提供していただいた。

表15 育成した「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統

系統名	組合せ ^{注1)}	世代 ^{注2)}	系統数	導入QTL または遺伝子	
				耐冷性	いもち病抵抗性
東1489	ひとめぼれ/Kuchum/6*ひとめぼれ	B ₆ F ₇	1	<i>qCT-4</i>	
13P-701～705	東1380/羽系1394	F ₄	5	<i>qCT-4</i> 、 <i>qLTB3</i>	
13P-706～710	羽系1394/東1384	F ₄	5	<i>qLTB3</i>	「Silewah」由来
13P-711～713,715～716	09EL110-4/ひとめぼれ//ひとめぼれ	B ₁ F ₄	5		<i>Pi39(t)</i>
13P-717	09EL111-2/ひとめぼれ//ひとめぼれ	B ₁ F ₄	1		<i>Pi34</i>
13P-718～719	ひとめぼれ/ゆきのはな/3*ひとめぼれ	B ₃ F ₄	2		<i>Pi35(t)</i>
13P-720～727	09EL113-1/ひとめぼれ//ひとめぼれ	B ₁ F ₄	8		<i>Pb1</i>
11P-412	06AH35-4/ひとめぼれ//ひとめぼれ	B ₁ F ₄	1		<i>Pias(t)</i>

注1) 東1380:ひとめぼれ/Kuchum/6*ひとめぼれ、東1384: Silewah/5*ひとめぼれ

羽系1394(のちの「奥羽415号」): 羽系840/ひとめぼれ//ひとめぼれ

羽系840: ひとめぼれ/麗江新団黒谷//ひとめぼれ

09EL110-4: みねはるか/3*ひとめぼれ

09EL111-2: 中部32号/3*ひとめぼれ

09EL113-1: 羽系835/3*ひとめぼれ、羽系835: 奥羽371号/中部105号

06AH35-4: 羽系854/ひとめぼれ、羽系854: おきにいり/あそみのり//おきにいり

注2) 東1489が2012年、13P-No. は2013年、11P-412は、2011年の世代を示す。

表16 導入領域とMASに使用したDNAマーカー

染色体	耐冷性		いもち病抵抗性遺伝子					
	<i>qCT-4</i>	<i>qLTB3</i>	<i>Pias</i> (t)	「Silewah」由来	<i>Pi39</i> (t)	<i>Pi34</i>	<i>Pi35</i> (t)	<i>Pb1</i>
4	9_1(#5) ～ S38P21-1(#12)							
4, 3	Indel_2(#3) ～ S38P21-1(#12)	RM6970～RM7389						
3, 4		RM6970～RM7389		XAIMS5～RM317				
4						RM349		
11						RM2596		
1							P33685 ^{注)}	
11								RM206
4			YX4-5～RM5709					

注) (独) 農研機構中央農業総合研究センター安田氏より提供。

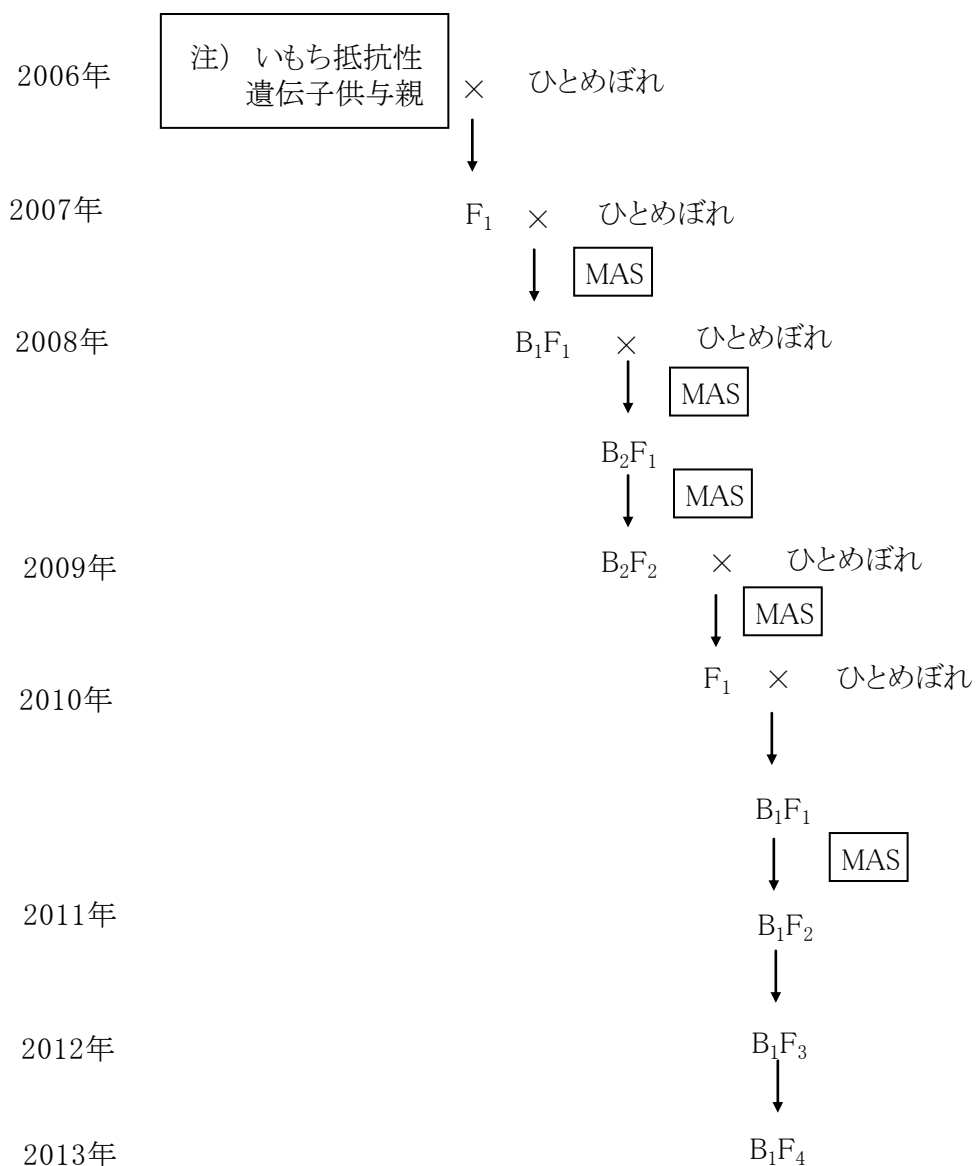


図11 「13P-711」～「13P-713」、「13P-715」～「13P-717」、

「13P-720」～「13P-727」の育成経過

注) 「13P-711」～「13P-713」、「13P-715」、「13P-716」は「みねはるか」、

「13P-717」は「中部 32 号」、「13P-720」～「13P-727」は「羽系 835」である。

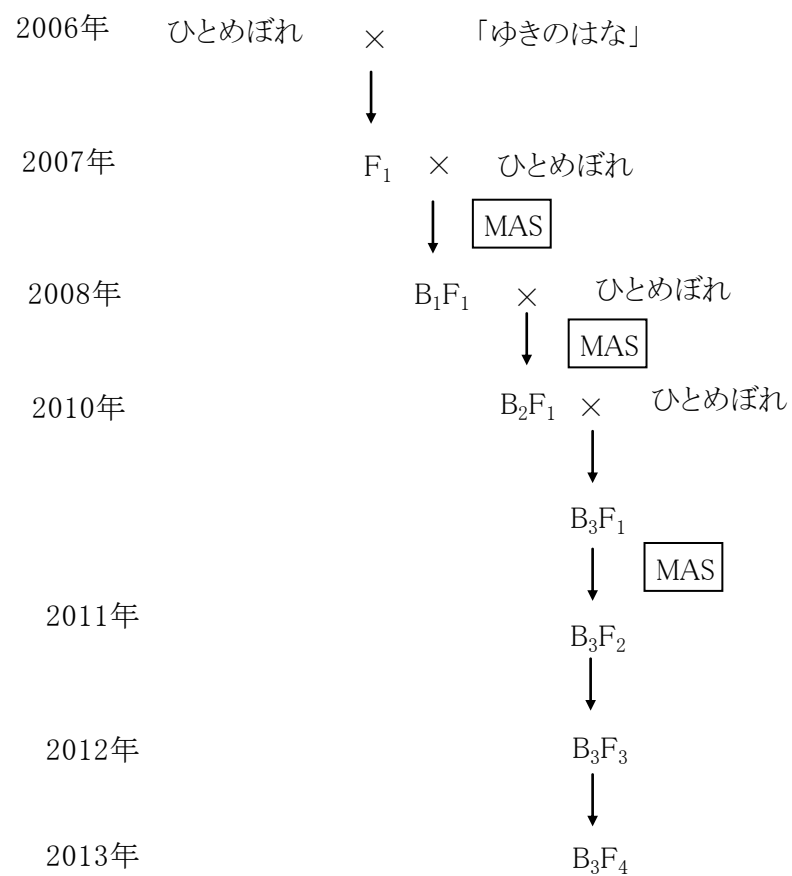


図12 「13P-718」と「13P-719」の育成経過

(2) 方法

農業形質の評価は、試験圃場(宮城県大崎市:古川農業試験場)において、出穂期、成熟期、稈長、穂長を調査した。4月中旬に播種、5月下旬に移植し、栽植密度は22.2株/m²(畝間24cm×株間15cm)で1株4本植とし、施肥は基肥N成分4kg/10aとした。除草と病虫害防除は、慣行法により行った。試験区は、2012年が2反復、2011年と2013年は反復なしとした。耐冷性の評価は第2章第1節1)(2)と同様に行った。検定水温は、耐冷性のQTLを導入した系統は18.5℃、それ以外の系統は、通常の検定水温である19℃で行った。いもち病圃場抵抗性の検定は、第Ⅲ章第1節1)(2)と同様に、畑晩播法によって行った。各系統は、4葉期の苗にいもち病菌レース(003、007)を噴霧接種し、両レースに罹病性を示したものをN区(真性抵抗性遺伝子型:+、*Pia*)、003に対して抵抗性反応を示した系統をI区(真性抵抗性遺伝子型:*Pii*)とし、真性抵抗性遺伝子型毎に試験区を分けて配置し、各試験区に発病を促すために前年の罹病葉(N区:蒙古稻、I区:54系3110)を散布した。発病程度は、浅賀(1981)の方法により、0(無病徴)～10(全茎葉枯死)の判定基準に基づいて、7月下旬から8月上旬にかけて2～3回調査した。

2) 結果

耐冷性QTLの $qCT-4$ と $qLTB3$ を単独で導入した「東1489」と「13P-706」～「13P-710」は、同年の18.5℃の検定条件下において、「ひとめぼれ」に比べて稔実率が10%高く、 $qCT-4$ と $qLTB3$ を集積した「13P-701」～「13P-705」では約20%高かった

(表 17)。これは、耐冷性の基準品種である「トドロキワセ」(耐冷性 “極強”)や「オオトリ」(耐冷性 “強”)の稔実率を大きく上回っていることから、これらの系統の耐冷性は、「ひとめぼれ」に優る“極強以上”であると判定された。いもち病圃場抵抗性遺伝子を導入した系統の耐冷性は、処理水温 19℃の検定条件下において、「ひとめぼれ」との稔実率の差が 5%以下であったことから、「ひとめぼれ」と同じ“極強”であると判定された(表 17)。

表17 「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統の耐冷性

年次	試験番号 または 品種名	導入QTL または遺伝子		系統数	稔実率(%) ^{注1)}		耐冷性 ^{注2)} ランク
		耐冷性	いもち病抵抗性		19℃	18.5℃	
2013	13P-701～705	<i>qCT-4</i> 、 <i>qLTB3</i>		5	84.0±1.0		極強以上
	13P-706～710	<i>qLTB3</i>	「Silewah」由来	5	75.0±3.5		極強以上
	13P-711～713,715～716		<i>Pi39(t)</i>	5	87.0±1.2		極強
	13P-717		<i>Pi34</i>	1	90.0		極強
	13P-718～719		<i>Pi35(t)</i>	2	85.0±0.0		極強
	13P-720～727		<i>Pb1</i>	8	88.8±0.8		極強
	ひとめぼれ			1	85.0	65.0	極強
	トドロキワセ			1	60.0	30.0	(極強)
	オオトリ			1	55.0	15.0	(強)
2012	東1489	<i>qCT-4</i>		1		67.5	極強以上
	ひとめぼれ			1		57.5	極強
	トドロキワセ			1		17.5	(極強)
	オオトリ			1		10.0	(強)
2011	11P-412		<i>Pias(t)</i>	1		80.0	極強
	ひとめぼれ			1		75.0	極強
	トドロキワセ			1		65.0	(極強)
	オオトリ			1		55.0	(強)

注1) 恒温深水法による検定(水深25cm, 設定水温19℃、または18.5℃)

注2) 括弧内は基準品種の判定基準。

いもち病圃場抵抗性検定において、「Silewah」由来のいもち病抵抗性遺伝子や、*Pi39(t)*、*Pi35(t)*を導入した系統は、いもち病の発病抑制効果が高かった(表 18)。「Silewah」由来のいもち病抵抗性遺伝子を導入した系統「13P-706」～「13P-710」、*Pi39(t)*を導入した「13P-711」～「13P-713」、「13P-715」及び「13P-716」の発病程度は、N 区の基準品種「こころまち」(いもち病圃場抵抗性 “強”)や I 区の基準品種「中部 45 号」(いもち病圃場抵抗性 “強”)よりも 0.3～1.1 小さく、*Pi35(t)*を導入した「13P-718」と「13P-719」では、N 区において発病程度が「こころまち」より 1.7 低かった。*Pi34*を導入した「13P-717」の発病程度は 2.8 と、上記の 3 遺伝子よりは発病抑制効果は小さかったものの、I 区の基準品種「中部 45 号」の発病程度が 2.4 であったことから、圃場抵抗性は“強”と判定された。また、*Pb1*を導入した系統「13P-720」～「13P-727」は、N 区と I 区で評価が異なり、N 区では発病程度 6.3 と基準品種「陸奥光」(いもち病圃場抵抗性 “弱”)より高く“弱”、I 区では発病程度 3.9 で、基準品種「中部 45 号」と「まなむすめ」(いもち病圃場抵抗性 “中”)の間となり “やや強”の評価となった。*Pias(t)*を導入した「11P-412」は、発病程度が 6.4 となり、基準品種の「まなむすめ」の 7.0 よりやや低く、圃場抵抗性は“やや強”と判定され、他のいもち病抵抗性遺伝子と比較すると、その発病抑制効果は小さかった。耐冷性 QTL のみを導入した「東 1489」と「13P-701」～「13P-705」のいもち病圃場抵抗性は、「ひとめぼれ」と同程度かやや劣る “弱”と判定された。

耐冷性といもち病抵抗性以外の農業形質は、出穂期、成熟期は、いずれの系統も「ひとめぼれ」と 2 日以内の差となり、ほぼ同熟期であった(表 18)。稈長と穂長につい

ては、多くの系統が「ひとめぼれ」と 2cm 以内の差であったが、「13P-706」～
「13P-710」と「11P-412」の稈長が、「ひとめぼれ」よりそれぞれ 5cm、3.8cm 長くなった。
それ以外については、実用上問題となるような不良形質は確認されなかった。

表18 「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統のいもち病圃場抵抗性

年次	試験番号 または 品種名	導入QTL または遺伝子		系統数	試験区 ^{注1)}	いもち病	いもち病 ^{注2)}
		耐冷性	いもち病抵抗性			発病程度	圃場抵抗性
2013	13P-706～708	<i>qLTB3</i>	「Silewah」由来	2	N	2.2 ± 0.1	強
	13P-711、715		<i>Pi39(t)</i>	2	N	2.2 ± 0.2	強
	13P-718～719		<i>Pi35(t)</i>	2	N	1.6 ± 0.1	強
	13P-720～722		<i>Pb1</i>	3	N	6.3 ± 0.5	弱
	こころまち			1	N	3.3	(強)
	スノーパール			1	N	4.8	(中)
	陸奥光			1	N	5.9	(弱)
	13P-701～705	<i>qCT-4</i> 、 <i>qLTB3</i>		5	I	5.5 ± 0.2	弱
	13P-709～710	<i>qLTB3</i>	「Silewah」由来	3	I	2.1 ± 0.1	強
	13P-712、713、716		<i>Pi39(t)</i>	3	I	1.6 ± 0.2	強
	13P-717		<i>Pi34</i>	1	I	2.8	強
	13P-723～727		<i>Pb1</i>	5	I	3.9 ± 0.3	やや強
	ひとめぼれ			1	I	6.8	弱
	中部45号			1	I	2.4	(強)
	まなむすめ			1	I	5.8	(中)
	イナバワセ			1	I	5.2	(弱)
2012	東1489	<i>qCT-4</i>		1	I	7.4	弱
	ひとめぼれ			1	I	6.9	やや弱
	中部45号			1	I	5.7	(強)
	まなむすめ			1	I	7.1	(中)
	イナバワセ			1	I	7.1	(弱)
2011	11P-412		<i>Pias(t)</i>	1	I	6.4	やや強
	ひとめぼれ			1	I	6.9	中
	中部45号			1	I	2.3	(強)
	まなむすめ			1	I	7.0	(中)
	イナバワセ			1	I	8.3	(弱)

注1) 各系統の真性抵抗性遺伝子型は、いもち病菌のレース(003、007)を4葉期の苗に噴霧接種し、両レースに罹病性を示したものをN区(真性抵抗性遺伝子型: +、*Pia*)、003に対して抵抗性反応を示した系統をI区(真性抵抗性遺伝子型: *Pii*)と試験区を分けて配置し、発病を促すために前年の罹病葉(N区: 蒙古稲、I区: 54系3110)を散布して、いもち病圃場抵抗性の検定をおこなった。

注2) 括弧内は、基準品種の評価。

表19 「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統のその他の農業形質の評価

年次	系統名 または 品種名	導入QTL または遺伝子		系統数	出穂期 (月.日)	成熟期 (月.日)	稈長 (cm)	穂長 (cm)
		耐冷性	いもち病抵抗性					
2013	13P-701～705	<i>qCT-4</i> 、 <i>qLTB3</i>		5	8.7±0.2	9.15±0.9	84±0.9	17.6±0.2
	13P-706～710	<i>qLTB3</i>	「Silewah」由来	5	8.8±0.4	9.14±0.5	87±1.0	18.2±0.2
	13P-711～713,715～716		<i>Pi39(t)</i>	5	8.8±0.2	9.15±0.2	82±0.6	18.1±0.1
	13P-717		<i>Pi34</i>	1	8.9	9.17	82	17.5
	13P-718～719		<i>Pi35(t)</i>	2	8.8±0.0	9.13±1.5	81±0.6	17.6±0.4
	13P-720～727		<i>Pb1</i>	8	8.9±0.2	9.14±0.6	81±0.7	18.3±0.2
	ひとめぼれ			2	8.9±0.0	9.15±0.0	82±2.2	17.4±0.0
2012	東1489	<i>qCT-4</i>		1	8.6	9.14	75.4	18.3
	ひとめぼれ			1	8.6	9.14	77.8	18.6
2011	11P-412		<i>Pias(t)</i>	1	8.6	9.20	85.3	18.1
	ひとめぼれ			1	8.6	9.20	81.5	18.6

注) 数値は、平均値±標準誤差を示す。

3) 考察

*qCT-4*を単独で導入した「東 1489」、*qCT-4*と *qLTB3*の 2 つを導入した「13P-701」～「13P-705」は、耐冷性が向上し、それ以外の農業形質で不良形質が現れることがなかったことから、これらの系統は「ひとめぼれ」の耐冷性準同質遺伝子系統として実用的な系統であると考えられた。国内では、第 1 章で述べた *Ctb1*、*Ctb2*を導入した「北海 IL1 号」、*qCTB8*を導入した「北海 IL2 号」、*Ctb1*と *qCTB8*を導入した「北海 IL3 号」、国外では日本品種「トワダ」に中国品種「昆明白白谷 (Kunmingxiaobaigu)」の耐冷性 QTL を導入した準同質遺伝子系統が育成されており (Zhou et al. 2012)、今後これらの系統が、耐冷性育種や耐冷性に関与する遺伝子の同定、あるいは耐冷性の作用機作に関する研究のための素材になっていくものと考えられた。

いもち病抵抗性遺伝子を導入した準同質遺伝子系統は、発病抑制効果に差が見られた。発病抑制効果は、*Pi35(t)*、*Pi39(t)*が最も高く、次に *Pi34* が高く、*Pb1* と *Pias(t)* の発病抑制効果は小さかった。いもち病圃場抵抗性を実用品種に導入した準同質遺伝子系統は、日本各地で既に育成されており、*Pb1* を導入した「コシヒカリ愛知 SBL」、*Pi34* を導入した「コシヒカリ」準同質遺伝子系統の「中国 IL1 号」、「中国 IL2 号」、*Pi35(t)*を導入した「ゆめあかり」の準同質遺伝子系統「青系 IL1 号」、同じく *Pi35(t)*を導入した「つがるろまん」の準同質遺伝子系統「青系 IL2 号」がある。これらは、いもち病抵抗性が付与された以外は、原品種と大きな差はなく、不良形質の報告もない。本研究で育成した準同質遺伝子系統についても、不良形質が認められないことから、実用性が高いと考えられた。*Pb1* 導入系統の発病抑制効果が小さかったが、*Pb1* の発現が生

育期後半に高まることが明らかになっており(Hayashi et al. 2010)、本研究では、葉いもちの発病程度のみを検定であったため、その効果が現れていなかったものと推測された。*Pb1* については、既に遺伝子が単離されており、典型的な病害抵抗性遺伝子 CC-NBS-LRR 型の構造をもち、WRKY45 タンパク質の分解が抑えられ、抵抗性反応が誘導されることが明らかになっている(Hayashi et al. 2010)。本研究で育成した *Pb1* を導入した準同質遺伝子系統については、穂いもち抵抗性を評価することで *Pb1* の導入効果が確認できると推察される。

qLTB3 に加えて「Silewah」由来のいもち病抵抗性遺伝子を集積した「13P-706」～「13P-710」においては、いもち病抵抗性と耐冷性を同時に向上させることができた。*Ctb1*、*Ctb2*を導入した「北海 IL1 号」や *Ctb1*を導入した「北海 IL3 号」では既に耐冷性といもち病抵抗性の同時付与が確認されていたが(農業・食品産業技術研究機構 作物研究所稲研究領域 2013)、本研究で育成した系統は、異なる遺伝子座を集積したものである。耐冷性といもち病抵抗性は、その作用機作が異なるため、両形質に関わる *qCT-4*、*qLTB3*、*Pi39(t)*、*Pi35(t)*、*Pi34*、*Pias(t)*、*Pb1*等の遺伝子の集積を進めることで、両形質の特性が比較的容易に向上すると考えられる。本研究で育成した準同質遺伝子系統が、集積系統の育種母本として有効に活用されていくことが期待される。

第V章 総合考察

「Silewah」由来の *Ctb1*、*Ctb2*、「北海 PL9」由来の *qCTB8*を導入した「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統の耐冷性が、「ひとめぼれ」に比べて強くならなかったことから、耐冷性に関与する QTL を実用品種に導入してその効果を得るには、QTL と導入する品種の遺伝背景や環境要因との関係が重要であることが示唆された。本研究で供試した「ひとめぼれ」は、「コシヒカリ」由来の穂ばらみ期耐冷性 QTL である *qCT-1*、*qCT-7*、*qCT-11* を既に保有しており (Shirasawa et al. 2007)、「Silewah」由来の *Ctb1*、*Ctb2* や「北海 PL9」由来の *qCTB8* との集積効果が小さかったものと考えられる。*qCT-4* と *qLTB3* の単独の効果は「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統で明確に示されたものの、これらの2つの QTL の集積効果は本研究では十分に示すことができなかったが、同様のことが *Ctb1*、*Ctb2* や *qCTB8* と *qCT-1*、*qCT-7*、*qCT-11* との間であった可能性が考えられる。*Ctb1*、*Ctb2*、*qCTB8* と *qCT-1*、*qCT-7*、*qCT-11* の関連は不明であるが、この関係を明らかにするには、個々の QTL をこれらの QTL を持たない同一の遺伝背景にのせた準同質遺伝子系統を作成し、個々の作用力を評価することが有効であろう。また、それらの QTL を組み合わせて、その作用力を検討することで、QTL 間の相互作用が明らかになると考えられる。環境要因による影響については、遺伝子が同定されたものでは、それぞれの環境条件下で、遺伝子発現を確認することが最も確実な方法であるが、多くの耐冷性 QTL で遺伝子が単離されていない現状では、その確認は難しい。Kuroki et al. (2009) は、北海道品種「初雫」を用いた耐冷性の遺伝解析により、

第 1 染色体の RM1003 から RM3482 間に耐冷性に関わる QTL を見出しており、この領域が「コシヒカリ」で見出されている *qCT-1* の領域と重複していることを報告している。この領域には、「初雫」が栽培されている北海道と「コシヒカリ」が栽培されている東北地方以南で有効な QTL が存在していることを示しているかもしれない。したがって、栽培地域等の環境条件を変えた QTL 解析を実施することで、環境要因による QTL の効果の有無を間接的に評価できるであろう。

佐竹・柴田(1992)は、受精構成要素による耐冷性品種の評価を試みて、受精率を 4 要素(分化小胞子数、発育花粉歩合、受粉歩合及び柱頭上花粉の受精効率)の積によって表し、耐冷性の異なる品種では、受精構成要素間に品種間差があることを確認した。さらに、冷温処理した品種の受精率(すなわち耐冷性)の品種間差異の大部分が、分化小胞子数、発育花粉歩合及び受粉歩合の 3 要素によって説明できることを示した。Saito et al.(2001)は、「きらら 397」と「中母農 8 号」の耐冷性が関与する第 3 染色体と第 4 染色体の領域のみが分離した準同質遺伝子系統の葯長を調べた結果、第 4 染色体上に位置する DNA マーカー R2737 の遺伝子型が、「中母農 8 号」(「Silewah」)型の系統が、「きらら 397」型の系統の葯長よりも有意に長くなったことを示した。このことは、第 4 染色体の *Ctb1*、*Ctb2* が、大きな葯にすることによって耐冷性を強くしていることを示唆している。葯が大きくなることは、葯内に格納できる花粉数が多くなると推測されるため、受精構成要素に対応させると、*Ctb1*、*Ctb2* が分化小胞子数と発育花粉歩合に関与する遺伝子であることが推察された。Saito et al.(2010)は、マップベースクローニングの手法により、*Ctb1* を単離し、原因遺伝子が F-box タンパクを

コードする遺伝子であることを報告している。本研究において育成した *qCT-4* を導入した耐冷性の準同質遺伝子系統で耐冷性が強くなった原因は不明であるが、葯長や花粉数を「ひとめぼれ」と比較することにより、受精構成要素との関連が明らかになるかもしれない。また、これらの準同質遺伝子系統は、耐冷性の遺伝子を同定したり、耐冷性の生理機構を解明するための素材としても利用できるであろう。

いもち病抵抗性育種において、外国稲や陸稲、野生イネのような多様な遺伝資源から様々な遺伝子を探索することは、抵抗性の持続性や安定性を確保する上で重要である。Fukuoka et al. (2009) は、いもち病抵抗性遺伝子 *pi21* が食味を悪くする領域と強く連鎖していることを示し、その連鎖を解消するために DNA マーカーが有効であることを実証した。したがって、多様な遺伝資源を利用していく上で、それらの遺伝資源がもつ長稈、低収、食味や品質の低下、穂発芽性など連鎖する不良形質の存在を明らかにしていくことが重要である。「あそみのり」を交配母本として利用した後代からは、いもち病や白葉枯病に優れる「ミヤコ 95」(西山ら 1992) や「ヨカミノリ」、「南海 119 号」が育成されている。本研究で用いた「あそみのり」と「おきにいり」の戻し交配系統である「奥羽 411 号」についても、一般品種並の農業形質を備えており、2010 年に「きんのめぐみ」として品種登録の出願がされた(梶ら 2013)。これらのことから、*Pias(t)* は、致命的な不良形質を伴っている可能性は低いと考えられた。

本研究で見出した「あそみのり」由来のいもち病圃場抵抗性遺伝子 *Pias(t)* は、白葉枯病害抵抗性遺伝子 *Xa1-as(t)* と密接に連鎖していることが特長であり、両病害抵抗

性を含む領域を導入することで、両抵抗性を同時に得られる利点がある。また、*Pias*(t) は、連鎖する DNA マーカーとともに、表現型マーカーであるフェノール着色反応の有無によって、抵抗性の有無を間接的に選抜できる。このことは、選抜手法の省力化、簡易化が図れるという意味で、品種育成の観点からは有用である。これまで、多数のいもち病抵抗性遺伝子が報告されているが(Koide et al. 2009)、それらの遺伝子を実際の実用品種に導入し、その発病抑制効果を示した事例は少ない。今後、抵抗性遺伝子を実用品種に導入し、その効果を検証していくことが重要と考えられる。また、安定的ないもち病抵抗性を発揮するためには、多様な遺伝子の集積が有効であると考えられる。さらに、*Pias* (t)と *Xa1-as*(t)のように複数の病害抵抗性遺伝子が局在しているゲノム領域を集積していくことは、今後、病害抵抗性育種を効率的に進める上で有効な手法の一つであると考ええる。

本研究により、「ひとめぼれ」の耐冷性やいもち病抵抗性の更なる向上が、*qCT-4*、*qLTB3*、*Pi39*(t)、*Pi35*(t)、*Pi34*、*Pias*(t)、*Pb1* 等の遺伝子を導入することで図れることが明らかになった。多様な遺伝資源から新たな耐冷性やいもち病抵抗性遺伝子が同定されていけば、それらの遺伝子の集積を進めていくことにより、1993年の冷害を克服できるような品種開発ができるかもしれない。現在、イネのゲノム上では、いもち病抵抗性や縞葉枯病抵抗性などの病害抵抗性、トビイロウンカやツマグロヨコバイなどの耐虫性、出穂性、食味、外観品質、収量性、高温登熟性、低温発芽性など主要な形質の遺伝子の位置が明らかになっており、これらの情報をもとに、DNA マーカー選抜を利用した品種育成が進んでいる(石井 2010)。今後は、これらの情報を組み合わせることによ

って、耐冷性やいもち病抵抗性に加えて、生産者や消費者のニーズ、栽培する環境に合わせた品種育成が可能となるだろう。

第VI章 摘 要

本研究では、冷害年のイネの不稔障害やいもち病の被害を軽減することを目的として、耐冷性に関与する QTL やいもち病抵抗性遺伝子を、DNA マーカーを用いて導入し、「ひとめぼれ」の準同質遺伝子系統を育成することを試みた。

1. 既知の耐冷性 QTL を導入した「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統の耐冷性評価

イネの障害型耐冷性に関する QTL として、インドネシア品種「Silewah」に由来する *Ctb1*、*Ctb2*、北海道品種「北海 PL9」に由来する *qCTB8* の耐冷性 QTL を導入した「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統を育成し、その耐冷性の向上効果について検討した。その結果、*Ctb1*、*Ctb2* をそれぞれ単独で保有、もしくは両方保有するかに関わらず、耐冷性の向上効果は確認できなかった。*qCTB8* を導入した「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統も、同様に耐冷性の向上はみられなかった。これらの QTL の効果が出ない要因は不明であるが、「ひとめぼれ」の遺伝背景や、北海道と東北における気温等の環境要因の差が遺伝子の作用に影響していることが推察された。

2. ブータン品種「Kuchum」に見出された新規耐冷性 QTL の同定

ブータン品種「Kuchum」を耐冷性の供与親、「ひとめぼれ」を反復親とする準同質遺伝子系統を育成し、「Kuchum」が保有する穂ばらみ期耐冷性 QTL である *qCT-4* の詳細な位置の特定を行った。その結果、*qCT-4* 近傍に「Kuchum」型の染色体領域を持

つ 19 種類の準同質遺伝子系統が得られ、その遺伝子型と稔実率の結果から、*qCT-4* は、第 4 染色体長腕の DNA マーカー Indel_7(#6)から 10_13(#13)の間、約 1.0Mbp の領域に存在すると推定された。*qCT-4* の耐冷性向上効果は、ホモ接合にして稔実率で概ね 10%未満と推測された。

3. 耐冷性 QTL の集積効果

*qCT-4*と中国品種「麗江新団黒谷」から見出された耐冷性 QTL の *qLTB3* の集積効果について検討した。単一の *qCT-4*、*qLTB3* を導入したグループは、どちらの QTL を含まないグループに比べて、耐冷性の有意な向上効果が認められた。2 つの QTL を導入したグループもどちらの QTL を含まない系統に比べて有意な耐冷性の向上を示し、単一の *qCT-4*、*qLTB3* を導入したグループと比べて、有意差は認められなかったものの、2 カ年とも稔実率は 1.0~9.3%増加した。

4. 「あそみのり」の交配後代のいもち病抵抗性と白葉枯病抵抗性

水稻品種「あそみのり」は、白葉枯病とともにいもち病抵抗性に優れることが一部の育種家の間で経験的に知られていたが、その詳細は不明であった。「あそみのり」を一回親、「おきにいり」(いもち病 “やや強”、白葉枯病 “罹病性”)を反復親とする戻し交配系統である「羽系 851、852、854、856、857」を育成した。これらの系統は、いもち病圃場抵抗性、いもち病抵抗性に優れ、第 4 染色体長腕に共通して保有する「あそみのり」型のゲノム領域 (RM5709~YX4-5)を見出した。「あそみのり」の交配後代である

「羽系 854」と「ひとめぼれ」の交配に由来する F_3 系統の遺伝解析の結果、白葉枯病が抵抗性である系統や共通のゲノム領域上の RM5473-2 の遺伝子型が「あそみのり」型の系統で発病程度が低くなる分布を示した。このことから、白葉枯病抵抗性、いもち病抵抗性、DNA マーカー RM5473-2 の 3 者が連鎖していると推測された。

5. 白葉枯病抵抗性遺伝子 *Xa1-as(t)* と連鎖したいもち病圃場抵抗性遺伝子 *Pias(t)* の候補領域の絞り込み

「あそみのり」由来のいもち病抵抗性遺伝子 *Pias(t)* 近傍組換え固定系統を育成し、いもち病発病程度や白葉枯病抵抗性、フェノール着色反応を調査した。その結果、*Pias(t)* は YX4-3 と NX4-1 の間の約 162kbp の間、白葉枯病抵抗性やフェノール着色反応遺伝子 *Ph* は、YX4-5 から RM5709 の間約 450kbp に座乗すると推定された。*Pias(t)* は、いもち病の発病程度を 1.2 低下させる作用力があることがわかった。以上のことから、「あそみのり」のいもち病圃場抵抗性 *Pias(t)* は、一遺伝子による多面発現ではなく、白葉枯病抵抗性遺伝子 *Xa1-as(t)* との連鎖関係にあることが明らかになった。

6. *Pias(t)* と *Xa1-as(t)* を保有する「奥羽 411 号」の農業実用形質

「奥羽 411 号」(のちの「きんのめぐみ」)の出穂期、成熟期は、「あきたこまち」より 2～3 日遅く、「ひとめぼれ」より 2 日程度早く、育成地(秋田県大仙市)では、“中生の中”、稈長、穂長は「あきたこまち」よりやや長く、「ひとめぼれ」と同程度、倒伏程度は、両品種に比べてやや優った。玄米千粒重は「あきたこまち」や「ひとめぼれ」と比べて 2～3g

大きく、玄米収量はそれぞれ、「あきたこまち」対比 106%、「ひとめぼれ」対比 100%であった。玄米品種は、両品種に比べてやや劣り、食味は同程度だった。いもち病抵抗性については、葉いもち、穂いもちともに抵抗性であった。

7. 耐冷性といもち病抵抗性を導入した「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統の農業形質評価

qCT-4 と *qLTB3*、「Silewah」より得られたいもち病抵抗性遺伝子、*Pias(t)*、及び既に報告されているいもち病圃場抵抗性遺伝子 *Pi39(t)*、*Pi35(t)*、*Pi34* を導入した「ひとめぼれ」準同質遺伝子系統を育成し、農業形質の評価を行った。*qCT-4* を導入した系統は、耐冷性検定において「ひとめぼれ」に比べて稔実率が 10%増加し、*qCT-4* と *qLTB3* を集積した系統では稔実率が約 20%増加した。「ひとめぼれ」にいもち病抵抗性を導入した系統は、*Pias(t)*の発病抑制効果は小さかったが、「Silewah」由来いもち病抵抗性遺伝子、*Pi39(t)*、*Pi35(t)*、*Pi34* では、「ひとめぼれ」に比べて、いもち病の発病程度が大きく減少した。その他の農業形質においては、「ひとめぼれ」と比べて、出穂期、成熟期が 2 日以内、稈長は 2cm 以内、穂長は 1cm 未満の差であり、ほぼ同等であり、実用上問題となるような不良形質は確認されなかった。

謝 辞

本研究は、2003 年から 2013 年にかけて東北農業研究センター(2003～2007 年)及び宮城県古川農業試験場(2008～2013 年)において行ったものである。本論文の執筆にあたっては、東北大学大学院農学研究科西尾剛教授に懇切なご指導とご校閲をいただいた。耐冷性研究については、準同質遺伝子系統の育成、DNA マーカーの作成や選抜にあたり(独)農業生物資源研究所山本敏央氏、農林水産先端技術研究所(JATAFF 研究所)安藤露氏に多大なるご支援をいただいた。いもち病抵抗性研究については、DNA マーカーの作成や候補遺伝子のマッピングにあたり東北農業研究センター中村俊樹氏、石川吾郎氏、(独)農業生物資源研究所米丸淳一氏に多大なるご支援をいただいた。白葉枯病菌については、九州沖縄農業研究センターより分譲していただいた。多型マーカーのスクリーニングにあたり(独)農業生物資源研究所矢野昌裕氏には、実験の機会を提供していただいた。耐冷性遺伝子のマーカー情報は、中央農業総合研究センターの斎藤浩二氏、いもち病抵抗性遺伝子のマーカー情報や試料は、東北農業研究センター善林薫氏、中央農業総合研究センター安田伸子氏に快くご提供いただいた。この場をかりて感謝申し上げる。

研究の遂行にあたっては、当時東北農業研究センター稲育種研究室室長山口誠之氏、宮城県古川農業試験場指定試験地主任永野邦明氏に、研究に対する理解と、適切なご助言、ご指導をいただいた。また、東北農業研究センターと宮城県古川農業試験場で共に水田や畑に入り、暑い夏場の調査や管理作業に従事しながら苦楽を共

にした諸先輩、同僚、農場業務職員、試験検査補助職員、臨時職員の方々には、深く感謝申しあげる。そして、東北農業研究センター中山壮一氏、西田端彦氏には、絶えず暖かい激励の声をかけていただいた。家族には、研究活動の支えとなる生活面をサポートしてもらった。この他、多くの方々からご協力、ご援助、ご助言をいただいた。ここにこれらの方々に深く感謝の意を表する。

引用文献

Abe, S (2004) Breeding of a blast resistant multiline variety of rice, Sasanishiki BL. JARQ38: 149-154.

安部信行・小高真一・鳥山国土・小林正男(1989)高度障害型耐冷性「水稻中間母本農8号」の育成とその特性. 北農試研報 152: 9-17.

Andaya V. C., D. J. Mackill (2003) QTLs conferring cold tolerance at the booting stage of rice using recombinant inbred lines from a *japonica* x *indica* cross. Theor. Appl. Genet. 106: 1084-1090.

浅賀宏一(1981)イネ品種のいもち病に対する圃場抵抗性の検定方法に関する研究. 農事試研報 35: 51-138.

Dai, L., X. Lin, C. Ye, K. Ise, K. Saito, A. Kato, F. Xu, T. Yu and D. Zhang (2004) Identification of quantitative trait loci controlling cold tolerance at the reproductive stage in Yunnan landrace of rice, Kunmingxiaobaigu. Breed. Sci. 54: 253-258.

遠藤洋和・蒔苗仁・森浩俊・倉橋永・栗原和夫(2007)20km 格子地域気候モデルによ

るヤマセ型低温の再現性と将来予測. 日本気象学会東北支部創立 50 周年記念
文集: 53-58.

遠藤貴司・永野邦明・我妻謙介・佐々木都彦・千葉文弥・薄木茂樹・佐伯研一・
佐藤浩子・酒井球絵・早坂浩志・松永和久(2013). 水稻高度耐冷性中間母本
系統「東北PL1〜4」について. 宮城古川農試報 11: 17-28.

藤井潔・早野由里子・杉浦直樹・林長生・坂紀邦・遠山孝通・井澤敏彦・朱宮
昭男(1999a)イネ縞葉枯病抵抗性品種が有する穂いもち抵抗性の遺伝子分析.
育種学研究 1: 203-210.

藤井潔・遠山孝通・杉浦直樹・坂紀邦・井澤敏彦・井上正勝・朱宮昭男(1999b)イネ縞
葉枯ウイルス抵抗性の日本型イネ品種月の光と姉妹系統に見いだされた穂いも
ち抵抗性の性質と家系分析. 育種学研究 1: 69-76.

Fukuoka, S. and K. Okuno (2001) QTL analysis and mapping of *pi21*, a recessive gene
for field resistance to rice blast in Japanese upland rice. Theor. Appl. Genet. 103:
185-190.

Fukuoka, S., N. Saka, H. Koga, K. Ono, T. Shimizu, K. Ebana, N. Hayashi, A.

Takahashi, H. Hirochika, K. Okuno and M. Yano (2009) Loss of function of a proline-containing protein confers durable disease resistance in rice. *Science* 325: 998–1001.

Hayashi, N., H. Inoue, T. Kato, T. Funao, M. Shirota, T. Shimizu, H. Kanamori, H. Yamane, Y. Hayano-Saito, T. Matsumoto, M. Yano and H. Takatsuji (2010) Durable panicle blast-resistance gene *Pb1* encodes an atypical CC-NBS-LRR protein and was generated by acquiring a promoter through local genome duplication. *Plant J.* 64: 498–510.

東正昭・小綿寿志(1995)葉いもち圃場抵抗性－畑晩播検定. 稲育育種マニュアル. 農業研究センター研究資料 30: 1–40.

東正昭(1996)東北地域におけるいもち病抵抗性育種. 育種学最近の進歩 38:11–14.

Ise, K (1998) Inheritance of resistance to bacterial leaf blight in differential rice variety Asominori, *IRRN* 23: 13–14.

石井卓朗(2010)DNA マーカー選抜による水稻品種の育成. 米麦改良: 9–17.

Ishizaki, K., T. Hoshi, S. Abe, Y. Sasaki, K. Kobayashi, H. Kasaneya, T. Matsui and S. Azuma (2005) Breeding of blast resistant lines in rice variety “Koshihikari” and evaluation of their characters. *Breed. Sci.* 55: 371-377.

Jeung, J. U., B. R. Kim, Y. C. Cho, S. S. Han, H. P. Moon, Y. T. Lee and K. K. Jena (2007) A novel gene, *Pi40(t)*, linked to the DNA markers derived from NBS-LRR motifs confers broad spectrum of blast resistance in rice. *Theor. Appl. Genet.* 115: 1163-1177.

梶亮太・太田久稔・福嶋陽・山口誠之・片岡知守・中込弘二・滝田正・横上晴郁・遠藤貴司・加藤浩・市場茂雄・辻内啓次郎 (2013) 精米時に胚盤が残りやすく栽培特性が優れる良食味水稻品種「きんのめぐみ」の育成. 東北農研研報 115:1-10.

Kataoka, T., H. Kato, T. Takita, N. Yokogami and M. Yamaguchi (2004) Selection of criterional varieties for evaluation of blast partial resistance of rice in the Tohoku Region of Japan. *Proceedings of the 3rd International rice blast conference, rice blast: interaction with rice and control*, pp. 123-129.

清沢茂久 (1969) 水稻品種ヤシロモチのいもち病抵抗性の遺伝子分析. *農業及び園芸*. 44: 407-408.

Kiyosawa, S (1982) Genetic and epidemiological modeling of breakdown of plant disease resistance. Annu. Rev. Phytopathol. 20: 93–117.

Koide, Y., N. Kobayashi, D. Xu and Y. Fukuta (2009) Resistance genes and selection DNA markers for blast disease in rice (*Oryza sativa* L.). JARQ43: 255–280.

Koizumi, S., T. Ashizawa and K. S. Zenbayashi (2004) Durable control of rice blast disease with multilines. In: Kawasaki, S. (ed) Rice blast: interaction with rice and control. Kluwer, Dordrecht pp.191–199.

越水幸男(1976)東北地方における冷害といもち病の発生.植物防疫 30: 485–490.

Kuroki, M., K. Saito, S. Matsuba, N. Yokogami, H. Shimizu, I. Ando and Y. Sato (2007) A quantitative trait locus for cold tolerance at the booting stage on rice chromosome 8. Theor. Appl. Genet. 115: 593–600.

Kuroki, M., K. Saito, S. Matsuba, N. Yokogami, H. Shimizu, I. Ando and Y. Sato (2009) Quantitative trait locus analysis for cold tolerance at the booting stage in a rice cultivar, Hatsushizuku. JARQ43: 115–121.

黒木 慎・斎藤 浩二・松葉 修一・横上 晴郁・安藤 露・佐藤 裕・安東 郁男・清水 博之

(2011)イネ系統「北海 PL9」の穂ばらみ期耐冷性に関する QTL の検出. 育種学
研究 13: 11-18.

Lincoln, S., M. Daly and E. Lander(1992) Constructing genetic maps with

MAPMAKER/EXP 3.0. Whitehead Institute Technical Report. 3rd edition.

Massachusetts.

松永和久・佐々木武彦・永野邦明・岡本栄治・阿部眞三・植松克彦・狩野篤・滝沢浩

幸・早坂浩志・薄木茂樹・黒田倫子・千葉文弥(2002)水稻新品種「はたじるし」に
ついて.宮城古川農試報 3: 85-99.

松永和久(2005)イネ穂ばらみ期耐冷性の高精度検定法「恒温深水法」の確立と耐冷

性遺伝子集積による高度耐冷性品種の育成. 宮城古川農試報 4: 1-78.

Miyamoto, M., M. Yano and H. Hirasawa (2001) Mapping of quantitaive trait loci

conferring blast field resistance in the Japanese upland rice variety Kahei. Breed.

Sci. 51: 257-261.

茂木 静夫・松本 省平・内藤 秀樹(1981)「あそみのり」のイネ白葉枯病高度ほ場抵

抗性.日本植物病理学会報47: 112-113.

Monosi, B., R. J. Wisser, L. Pennill and S. H. Hulbert (2004) Full-genome analysis of resistance gene homologues in rice. Theor. Appl. Genet. 109: 1434-1447.

Mori, M., K. Onishi, Y. Tokizono, H. Shinada, T. Yoshimura, Y. Numao, H. Miura and T. Sato (2011) Detection of a novel quantitative trait locus for cold tolerance at the booting stage derived from a *tropical japonica* rice variety Silewah. Breed. Sci. 61: 61-68.

Mundt, C. C. (2002) Use of multiline cultivars and cultivar mixtures for disease management. Annu. Rev. Phytopathol. 40: 381-410.

Nguyen, T. T. T., S. Koizumi, T. N. La, S. K. Zenbayashi, T. Ashizawa, N. Yasuda, I. Imazaki and A. Miyasaka (2006) *Pi35(t)*, a new gene conferring partial resistance to leaf blast in the rice cultivar Hokkai 188. Theor. Appl. Genet. 113: 697-704.

西山壽・八木忠之・轟 篤・小八重雅裕・黒木雄幸・日高秀光・愛甲一郎・吉田浩・本部裕朗(1992) 水稻新品種“ミヤコ 95”について. 宮崎総農試報 26:13-31.

Nishiyama, I. (1984) Climatic influence on pollen formation and fertilization. In
“Biology of Rice” eds. Tsunoda, S. and N. Takahashi, Japan Sci. Soc. Press,
Tokyo/Elsver, Amsterdam, pp. 135-171.

西山岩男(1996)冷害の歴史. 東北の稲研究. 鳥山国土・熊野誠一・浅賀宏一監修
(有)博光出版. 東北農業試験場稲作研究 100 年記念事業会, 秋田, pp.19-29.

農業・食品産業技術研究機構作物研究所稲研究領域(2013)水稻育成品種・系統の
来歴データベース. データ収録 CD-ROM 2013/12 版.

農林水産省経済局統計情報部. 作物統計(普通作物・飼料作物・工芸農作物). 平成
5 年産. 農林統計協会. 1995. p.84.

農林水産省大臣官房統計情報部. 作物統計(普通作物・飼料作物・工芸農作物). 平
成 15 年産. 農林統計協会. 2004. p.66.

小川紹文・関沢邦雄(1980)水稻の白葉枯病抵抗性育種に関する研究(第 2 報)剪葉
接種法によるわが国在来稲品種の量的抵抗性の検定. 中国農試報 A27: 19-36.

岡田正憲(1966)水稻品種ホウヨク・コクマサリとシラヌイの出来るまで. 農業および園
芸 41: 1741-1746.

大畑 貫一(1989). 稲の病害. 全国農村教育協会, pp.35-51.

Qu, S., G. Liu, B. Zhou, M. Bellizzi, L. Zeng, L. Dai, B. Han and G. L. Wang (2006)

The broad-spectrum blast resistance gene *Pi9* encodes a nucleotide-binding site-leucine-rich repeat protein and is a member of a multigene family in rice.

Genetics 172: 1901-1914.

Saito, K., K. Miura, K. Nagano, Y. Hayano-Saito, A. Saito, H. Araki and A. Kato

(1995) Chromosomal location of quantitative trait loci for cool tolerance at the booting stage in rice variety 'Norin-PL8'. Breed. Sci. 45: 337-340.

Saito, K., K. Miura, K. Nagano, Y. Hayano-Saito, H. Araki and A. Kato (2001)

Identification of two closely linked quantitative trait loci for cold tolerance on chromosome 4 of rice and their association with anther length. Theor. Appl. Genet. 103: 862-868.

Saito, K., Y. Hayano-Saito, M. Kuroki and Y. Sato (2010) Map-based cloning of the

rice cold tolerance gene *Ctb1*. Plant Sci. 179:97-102.

Saka, N (2006) A rice (*Oryza sativa* L.) breeding for field resistance to blast disease

(*Pyricularia oryzae*) in mountainous region agricultural research institute, Aichi agricultural research center of Japan. Plant Prod. Sci. 9: 3-9.

佐々木武彦・阿部眞三・松永和久・岡本栄治・永野邦明・丹野耕一・千葉芳則・狩野篤・植松克彦(1994). 水稻新品種「ひとめぼれ」について. 宮城古川農試報 2: 1-17.

Satake, T. and H. Hayase (1970) Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants. V. Estimation of pollen developmental stage and the most sensitive stage to coolness. Proc.Crop Sci. Soc. Japan 39: 468-473.

Satake, T., S. Y. Lee, S. Koike and K. Kariya (1988) Male Sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants. XXVIII. Prevention of cool injury with the newly devised water management practices: effects of the temperature and depth of water before the critical stage, Jpn. J. Crop Sci. 57: 234-241.

Satake, T. and K. Shibata (1992) Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants : XXXI. Four components participating in fertilization, Jpn. J. Crop Sci. 61: 454-462.

下野裕之(2008)地球温暖化が北日本のイネの収量変動に及ぼす影響. 日作紀 77:
489-497.

Shirasawa, K., H. Maeda, L. Monna, S. Kishitani and T. Nishio (2007) The number of
genes having different alleles between rice cultivars estimated by SNP analysis.
Theor. Appl. Genet. 115: 1067-1074.

Shirasawa, S., T. Endo, K. Nakagomi, M. Yamaguchi and T. Nishio (2012) Delimitation
of a QTL region controlling cold tolerance at booting stage of the rice cultivar
'Lijiangxintuanheigu'. Theor. Appl. Genet. 124: 937-946.

杉谷久任・松本崑士・田嶋修治・西山台司・岡田正憲・西山寿・本村弘美・志村英二
(1976) 水稻新品種「あそみのり」について. 熊本農試報 6:1-13.

杉浦直樹・辻孝子・藤井潔・加藤恭広・坂紀邦・遠山孝道・早野由里子・井澤敏彦
(2004) 水稻病害抵抗性付与のための連続戻し交雑育種における DNA 選抜の有
効性の実証. 育種学研究 6: 143-148.

Suh, J. P., J. U. Jeung, J. I. Lee, Y. H. Choi, J. D. Yea, P. S. Virk, D. J. Mackill and K.
K. Jena (2010) Identification and analysis of QTLs controlling cold tolerance at

the reproductive stage and validation of effective QTLs in cold-tolerant genotypes of rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 120: 985–995.

Takeuchi, Y., H. Hayasaka, B. Chiba, I. Tanaka, T. Shimano, M. Yamagishi, K. Nagano, T. Sasaki and M. Yano (2001) Mapping quantitative trait loci controlling cool-temperature tolerance at booting stage in temperate Japonica Rice. Breed. Sci. 51: 191–197.

Terashima, T., S. Fukuoka, N. Saka and S. Kudo (2008) Mapping of a blast field resistance gene *Pi39(t)* of elite rice strain Chubu 111. Plant Breeding 127: 485–489.

Thomson, D. and R. Henry (1995) Single-step protocol for preparation of plant tissue for analysis by PCR. BioTechniques 19: 394–400.

和田 定(1992). 水稻の冷害. 養賢堂, pp. 22–39.

Wang, S., C. J. Basten and Z. B. Zeng (2006) Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA.
(<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>).

Xu, L. M., L. Zhou, Y. W. Zeng, F. M. Wang, H. L. Zhang, S. Q. Shen and Z. C. Li (2008a) Identification and mapping of quantitative trait loci for cold tolerance at the booting stage in a *japonica* rice near-isogenic line. Plant Science. 174: 340-347.

Xu, X., H. Chen, T. Fujimura and S. Kawasaki (2008b) Fine mapping of a strong QTL of field resistance against rice blast, *Pikahei-1(t)*, from upland rice Kahei, utilizing a novel resistance evaluation system in the greenhouse. Theor. Appl. Genet. 117: 997-1008.

山口誠之(2009) 水稻の良食味・いもち耐病性品種の育成と耐病性の経済的効果の評価. 東北農研研報 110: 83-127.

山中 達・山口 富夫(1987). 稲いもち病. 養賢堂, pp.325-335.

Yoshimura, S., U. Yamanouchi, Y. Katayose, S. Toki, Z. X. Wang, I. Kono, N. Kurata, M. Yano, N. Iwata and T. Sasaki (1998) Expression of *Xa1*, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 1663-1668.

善林 薫・フェ デラペーニャ・芦澤武人・小泉信三(2002) 2001 年に北海道・東北地方
に分布したイネいもち病菌レース, 北日本病虫研報 53:19-23.

Zenbayashi, S. K., S. Fukuoka, S. Katagiri, M. Fujiwara, T. Matsumoto, T. Ashizawa
and S. Koizumi (2007) Genetic and physical mapping of the partial resistance gene,
Pi34, to blast in rice. *Phytopathology* 97: 598-602.

Zhou, L., Y. Zeng, G. Hu, Y. Pan, S. Yang, A. You, H. Zhang, J. Li and Z. Li (2012)
Characterization and identification of cold tolerant near-isogenic lines in rice.
Breed. Sci. 62: 196-201.

Zhu, Y., H. Chen, J. Fan, Y. Wang, Y. Li, J. Chen, J. Fan, S. Yang, L. Hu, H. Leung,
T. W. Mew, P. S. Teng, Z. Wang and C. C. Mundt (2000) Genetic diversity and
disease control in rice. *Nature* 406: 718-722.